

CAROLINA BUENO WANDSCHEER

**BIOATIVIDADE COMPARATIVA ENTRE *Melia azedarach* (Cinamomo) e  
*Azadirachta indica* (Nim): LETALIDADE PARA LARVAS DE *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas –  
área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, do  
Setor de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. José Domingos Fontana

CURITIBA

2004

## TERMO DE APROVAÇÃO

CAROLINA BUENO WANDSCHEER

"Bioatividade comparativa entre *Melia-azedarach* e *Azadirachta indica*:  
letalidade para larvas de *Aedes aegypti*"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

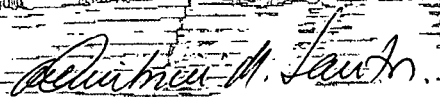


Prof. Tit. José Domingos Fontana (orientador)

Departamento de Farmácia  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Delsio Natal  
Departamento de Epidemiologia  
Universidade de São Paulo



Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos

Departamento de Farmácia  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 16 de fevereiro de 2004

Dedico este trabalho aos meus pais, Edgar e Tirza, aos meus irmãos, Clarissa e Edgar.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. José Domingos Fontana, pela atenção, confiança, apoio e orientação durante todo o trabalho.

Ao Professor Dr. Mário Antônio Navarro da Silva por toda a sua orientação e importante colaboração para realização desta dissertação.

Ao Dr. Maurício Passos pela orientação, colaboração e amizade em todo o período desta pesquisa.

Ao Dr. Rodrigo Rocha Latado pela orientação, colaboração e disponibilidade para realização do trabalho.

Aos meus amigos Juliana Adelman, Tânia Regina Bendlin e Jonathan Luís Wohlke, do LQBB – Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa, e do Jonny Edward Duque Luna, do LEMV – Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, por toda a ajuda e amizade.

Aos meus amigos e colegas de turma por todas as experiências compartilhadas, em especial a Lílian, Giovanna, Cláudia, Waldemar, Danilo e Elisa.

Aos funcionários da biblioteca do Setor da Saúde, a funcionária do xerox Sandra.

Aos colegas do departamento de Farmácia e de Entomologia do LEMV – Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio, aos seus professores, pelos ensinamentos ministrados e a Regina por toda a ajuda prestada.

E especialmente, aos meus pais e meus irmãos, por toda a colaboração, paciência, incentivo e muito apoio nos momentos difíceis.



"De tudo, ficaram três coisas  
A certeza de que estamos sempre começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto, devemos

Fazer da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro..."

Fernando Pessoa

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES... ..	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv

1.	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
2.	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>03</b>
3.	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>04</b>
3.1.	<i>Melia azedarach</i> L. e <i>Azadirachta indica</i> A. Juss .....	04
3.1.1	Origem.....	04
3.1.2	Classificação taxonômica.....	06
3.1.3	Constituintes químicos.....	07
3.1.4	Reação da cadeia polimerase (PCR).....	10
3.1.5	Atividade biológica.....	12
3.2	<b>DENGUE.....</b>	<b>19</b>
3.2.1	<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> .....	21
3.2.1.1	Características das formas e ciclo biológico.....	22
3.3	<b>ASTAXANTINA.....</b>	<b>24</b>
3.3.1	Ocorrência.....	24
3.3.2	Propriedades químicas.....	25
3.3.3	Emprego da astaxantina.....	26
3.3.4	Características gerais.....	27
3.3.5	Cultivo.....	28
3.3.6	Aplicações da levedura <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	29
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1	<b>MATERIAL.....</b>	<b>31</b>
4.1.1	Coleta de <i>Melia azedarach</i> L.....	31
4.1.2	Caroços de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. ....	31
4.2	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
4.2.1	Preparação de extrato de <i>Melia azedarach</i> L. ....	31
4.2.2	Preparação de extrato de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	32
4.2.3	Concentração dos extratos.....	32
4.2.4	Cromatografia em camada delgada (CCD) dos diferentes extratos de <i>Melia azedarach</i> L. e <i>Azadirachta indica</i> A Juss.....	32
4.2.5	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para os diferentes extratos de <i>Melia azedarach</i> L. e <i>Azadirachta indica</i> A Juss.....	33
4.2.6	Ensaio de bioatividade/citotoxicidade (BST - Brine Shrimp Lethality Test).....	33
4.2.7	Ensaio de bioatividade em larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	34
4.2.7.1	Condições de manutenção da colônia de <i>Aedes aegypti</i> .....	34
4.2.7.2	Bioensaios sob condições de laboratório com espécime de <i>Aedes aegypti</i> para determinação da suscetibilidade larval aos diferentes extratos de <i>Melia azedarach</i> L. e <i>Azadirachta indica</i> A Juss.....	35
4.2.7.3	Análise dos resultados dos bioensaios.....	37
4.2.8	Diferenciação das espécies de Meliáceas por PCR – Polymerase Chain Reaction.....	37
4.2.8.1	Extração de DNA de plantas.....	37
4.2.8.2	RAPD ( <i>Randon Amplified Polymorphic DNA</i> ): procedimento.....	37
4.2.9	Produção de astaxantina utilizando a levedura <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> em extratos de polpas dos frutos maduros de <i>Melia azedarach</i> L.....	38
4.2.9.1	Meio para manutenção de cepa.....	38
4.2.9.2	Preparo do inóculo.....	39
4.2.9.3	Preparo dos extratos de polpa de frutos de <i>Melia azedarach</i> L.....	39

4.2.9.4	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	39
4.2.9.5	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	40
4.2.9.6	Cultivo da levedura de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	40
4.2.9.7	Carboidratos redutores.....	41
4.2.9.8	Doseamento de astaxantina.....	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1	Cromatografia em camada delgada de diferentes extratos de <i>Melia azedarach</i> L. e <i>Azadirachta indica</i> A Juss.....	43
5.2	Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos diferentes extratos de Meliáceas.....	45
5.3	Resultados do ensaio preliminar de bioatividade/ citotoxicidade.....	48
5.4	Resultados de bioatividade testados contra larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	48
5.5	Diferenciação de espécimes por PCR.....	69
5.6	Determinação de carboidratos redutores.....	72
5.7	Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	72
5.8	Resultado do crescimento de <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> em polpas de frutos de <i>Melia azedarach</i> L.....	74
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 5.1 –	Concentração letal 50% dos diversos extratos totais em µg/ml.	48
TABELA 5.2 –	Representação em porcentagem das partes dos caroços de nim e cinamomo.....	53
TABELA 5.3 –	Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de <i>M. azedarach</i> L. e de <i>A. indica</i> A. Juss em extratos etanólicos para larvas de <i>A. aegypti</i> (colônia Rockefeller) sem alimento; temperatura; $X^2$ ; intervalo de confiança (IC).....	54
TABELA 5.4 –	Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de <i>M. azedarach</i> L. e de <i>A. indica</i> A. Juss em extratos etanólicos para larvas de <i>A. aegypti</i> (colônia Rockefeller) com alimento; temperatura; $X^2$ ; intervalo de confiança (IC).....	55
TABELA 5.5 –	Concentração diagnóstico ( $CL_{99}$ ) dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de <i>M. azedarach</i> L. e de <i>A. indica</i> A. Juss para larvas de <i>A. aegypti</i> (colônia Rockefeller) sem e com alimento, temperaturas 25°C e 30°C quando em presença de extratos <i>MaEtOH</i> e <i>AiEtOH</i> .....	56
TABELA 5.6 –	Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de <i>M. azedarach</i> L. e de <i>A. indica</i> A. Juss extratos clorofórmio:metanol para larvas de <i>A. aegypti</i> (colônia Rockefeller) sem alimento; temperatura; $X^2$ ; intervalo de confiança (IC).....	58
TABELA 5.7 –	Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de <i>M. azedarach</i> L. e de <i>A. indica</i> A. Juss extratos clorofórmio:metanol para larvas de <i>A. aegypti</i> (colônia Rockefeller) com alimento; temperatura; $X^2$ ; intervalo de confiança (IC).....	59
TABELA 5.8 –	Concentração diagnóstico ( $CL_{99}$ ), dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de <i>M. azedarach</i> L. e de <i>A. indica</i> A. Juss extratos clorofórmio:metanol para larvas de <i>A. aegypti</i> (colônia Rockefeller) sem e com alimento, temperaturas de 25°C e 30°C.....	61
TABELA 5.9 –	Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de <i>M. azedarach</i> L. e de <i>A. indica</i> A. Juss extratos metanólicos para larvas de <i>A. aegypti</i> (colônia Rockefeller) sem alimento; temperatura; $X^2$ ; intervalo de confiança (IC).....	63
TABELA 5.10 –	Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de <i>M. azedarach</i> L. e de <i>A. indica</i> A. Juss extratos metanólicos para larvas de <i>A. aegypti</i> (colônia Rockefeller) com alimento; temperatura; $X^2$ ; intervalo de confiança (IC).....	64

TABELA 5.11 –	Concentração diagnóstico (CL <sub>99</sub> ) dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de <i>M. azedarach</i> L. e de <i>A. indica</i> A. Juss extratos metanólicos para larvas de <i>A. aegypti</i> (Colônia Rockefeller) sem e com alimento, temperaturas 25°C e 30°C.....	66
TABELA 5.12 –	Experimento A.....	74

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 3.1 –	<i>Melia azedarach</i> L.....	04
FIGURA 3.2 –	Partes botânicas de <i>M. azedarach</i> .....	05
FIGURA 3.3 –	Partes botânicas de <i>A. indica</i> .....	06
FIGURA 3.4 –	Reinfestação de <i>A. aegypti</i> no continente Americano.....	20
FIGURA 3.5 –	Ciclo morfogênético de <i>A. aegypti</i> .....	23
FIGURA 3.6 –	Esquema do ciclo morfogênético de <i>A. aegypti</i> .....	24
FIGURA 4.1 –	Preparo dos biensaio.....	36
FIGURA 4.2 –	Incubadora onde foram realizados os bioensaio a temperatura e luminosidade controlada.....	36
FIGURA 5.1 –	Cromatografia em camada delgada.....	43
FIGURA 5.2 –	Cromatografia em camada delgada, visualização – UV 365nm.....	44
FIGURA 5.3 –	Cromatograma de extrato etanólico de <i>M. azedarach</i> L.1:50.....	46
FIGURA 5.4 –	Cromatograma de extrato metanólico de <i>M. azedarach</i> L. 1:50.....	46
FIGURA 5.5 –	Cromatograma de extrato clorofórmio: metanol de <i>M. azedarach</i> L.1:50.....	46
FIGURA 5.6 –	Cromatograma de extrato etanólico de <i>A. indica</i> A. Juss 1:50.....	47
FIGURA 5.7 –	Cromatograma de extrato metanólico de <i>A. indica</i> A. Juss 1:50.....	47
FIGURA 5.8 –	Cromatograma de extrato clorofórmio: metanol de <i>A. indica</i> 1:50.....	47
FIGURA 5.9 –	Síntese do hormônio juvenil acoplado a ecdisona.....	50
FIGURA 5.10 –	Bioensaio realizado com extrato etanólico de <i>M. azedarach</i> L. a 25°C sem alimento.....	51
GRÁFICO 5.1 –	Concentrações letais de extratos etanólicos de <i>M. azedarach</i> e <i>A.indica</i> em bioensaio sem alimentação.....	53
GRÁFICO 5.2 –	Concentrações letais de extratos etanólicos de <i>M. azedarach</i> e <i>A.indica</i> em bioensaio com alimentação.....	55
GRÁFICO 5.3 –	Concentrações letais de extratos clorofórmio:metanol de <i>M. azedarach</i> e <i>A. indica</i> em bioensaio sem alimentação.....	57
GRÁFICO 5.4 –	Concentrações letais de extratos clorofórmio:metanol de <i>M. azedarach</i> e <i>A. indica</i> em bioensaio com alimentação.....	58
GRÁFICO 5.5 –	Concentrações letais de extratos clorofórmio:metanol de <i>M. azedarach</i> e <i>A. indica</i> em bioensaio com alimentação.....	60
GRÁFICO 5.6 –	Concentrações letais de extratos clorofórmio:metanol dos menores valores encontrados de <i>M. azedarach</i> e <i>A. indica</i> em bioensaio com alimentação.....	60
GRÁFICO 5.7 –	Concentrações letais de extratos metanólicos de <i>M. azedarach</i> e <i>A. indica</i> em bioensaio sem alimentação.....	62
GRÁFICO 5.8 –	Concentrações letais de extratos metanólicos dos menores valores encontrados para <i>M. azedarach</i> e <i>A. indica</i> em bioensaio sem alimentação.....	63
GRÁFICO 5.9 –	Concentrações letais de extratos metanólicos de <i>M. azedarach</i> e <i>A. indica</i> em bioensaio com alimentação.....	65

GRÁFICO 5.10-	Concentrações letais de extratos metanólicos de <i>M. azedarach</i> e <i>A. indica</i> que apresentaram os menores resultados em bioensaios com alimentação.....	65
FIGURA 5.11 –	Amostras de RAPD em gel de agarose 1%; 1- <i>Azadirachta indica</i> A. Juss; 2- <i>Melia azedarach</i> L. e 3- <i>Zea mays</i> .....	70
FIGURA 5.12 –	Amostras de RAPD em gel de agarose 1%; 1- <i>Azadirachta indica</i> A. Juss; 2- <i>Melia azedarach</i> L. e 3- <i>Zea mays</i> .....	71
GRÁFICO 5.11-	Curva de calibração.....	72
FIGURA 5.13 –	Cromatograma de polpa hidrosolúvel de frutos de <i>M.azedarach</i> L. comparativamente aos padrões de glucose e frutose, monitorados por RID (Refratometria diferencial)...	73
GRÁFICO 5.12-	Produção de biomassa e astaxantina pela levedura <i>X. dendrorhous</i> em polpa aquosa diluída de <i>M. azedarach</i> .....	76
FIGURA 5.14 –	Produção de astaxantina pelo crescimento da levedura <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> em polpa de frutos maduros de <i>Melia azedarach</i> L.....	77



## LISTA DE ABREVIATURAS

Ai C:M - Extrato de clorofórmio e metanol de caroços de *Azadirachta indica* A. Juss  
Ai EtOH - Extrato etanólico de caroços de *Azadirachta indica* A. Juss  
Ai MeOH - Extrato metanólico de caroços de *Azadirachta indica* A. Juss  
BST - Brine Shrimp Test  
BSLT - Brine Shrimp Lethality Test  
CDC - Center for Disease Control  
CL<sub>50</sub> - concentração letal/ diagnóstico que corresponde à morte de 50% do espécime avaliado  
CL<sub>95</sub> - concentração letal/ diagnóstico que corresponde à morte de 95% do espécime avaliado  
CL<sub>99</sub> - concentração letal/ diagnóstico que corresponde à morte de 99% do espécime avaliado  
cm - centímetros  
CLAE (HPLC) - cromatografia líquida de alta eficiência  
DAD - Diode array detector  
DMSO - Dimetilsufóxido  
g - grama  
LC/MS - Liquid chromatography- mass spectrometry  
LEMV - Laboratório de entomologia médica e veterinária  
Ma EtOH - Extrato etanólico de caroços de *Melia azedarach* L.  
Ma MeOH - Extrato metanólico de caroços de *Melia azedarach* L.  
Ma C:M - Extrato clorofórmio:metanol de caroços de *Melia azedarach* L.  
mg - miligramas  
min - minutos  
ml - mililitros  
RID - Refractive index detector  
RPM - Rotações por minuto  
TL<sub>50</sub> - tempo letal mediano  
SFSC - sistema de fluido supercrítico  
S1 - sobrenadante aquoso de polpa de fruto maduro de *Melia azedarach* L.  
SL2 - sobrenadante S1 autoclavado  
UNICAMP - Universidade de Campinas  
μL - microlitros  
□ 0,5 - coeficiente de conversão

## RESUMO:

### **BIOATIVIDADE COMPARATIVA ENTRE *Melia azedarach* (cinamomo) e *Azadirachta indica* (nim) : LETALIDADE PARA LARVAS DE *Aedes aegypti***

No Brasil foram registrados 123.948 casos de dengue em 2003. *Melia azedarach* (cinamomo ou "santa bárbara") e *Azadirachta indica* (a árvore nim) são plantas meliáceas originárias da Ásia com futuro promissor para o fito-controle de pragas e de ampla distribuição mundial, sendo a primeira muito comum em todo território brasileiro. Apresentam propriedades bioinseticidas inibindo a alimentação e bloqueando crescimentos de insetos, incluindo a etapa fundamental de quitinogênese ou de formação / regeneração do exo-esqueleto durante a muda ou ecdise. Utilizamos extratos etanólicos, metanólicos e clorofórmico-metanólico de caroços de frutos maduros de *cinamomo* no controle biológico de *Aedes aegypti*, impedindo a evolução das larvas até a fase adulta, ou seja, impondo letalidade. Extratos equivalentes de Nim também foram ensaiados, normalizando as concentrações dos sólidos totais de todos ensaios em um solvente de menor toxicidade, o etanol, também empregado nos controles. Nestes ensaios de letalidade para as larvas do mosquito-da-dengue os parâmetros explorados foram então a concentração de princípios bioativos das duas meliáceas, por separado, a faixa de temperatura (25°C e 30°C) e ainda a alimentação ou não das larvas (ração padrão) durante o tempo de ação dos fitopesticidas naturais. As leituras foram feitas após 48 horas e determinadas as CL<sub>50</sub>, CL<sub>95</sub> e CL<sub>99</sub>. Os resultados com *M. azedarach* (cinamomo) são inéditos e as CL(s) obtidas, muito promissoras tais como as CL<sub>50</sub> de 0,035g% e de 0,059g% a 25°C, respectivamente obtidos com extrato etanólico / com alimentação e com extrato clorofórmico-metanólico / sem alimentação, este segundo coincidindo em eficiência com o primeiro no caso da adoção de alimentação. O extrato mais polar, metanólico, resultou em letalidade ainda mais pronunciada para as larvas com uma CL<sub>50</sub> de 0,014g% a 25°C na ausência de alimento, comparativamente à CL<sub>50</sub> de apenas 0,0043g/%, elevando-se a temperatura do ensaio para 30°C, este último o mais expressivo de todos resultados obtidos. Os dados referentes às CL<sub>50</sub> para *A. indica* (nim) estão de acordo com os encontrados na literatura e se situam, na média dos ensaios, abaixo dos valores nesta dissertação obtidos com *M. azedarach* (cinamomo), com destaque para o extrato etanólico de Nim com uma CL<sub>50</sub> a 30°C de 0,017g% no caso de larvas alimentadas. No escopo de viabilizar uma exploração ainda mais racional e preservacionista do cinamomo -- até mesmo como um mecanismo de inclusão social para pequenas comunidades sujeitas à febre da dengue -- ou seja, a integralidade de uso dos frutos colhidos, a polpa envoltória deles (mesocarpo) foi utilizada, com sucesso, para o cultivo da levedura astaxantinogênica *Xanthophyllomyces dendrorhous* (antes, *Phaffia rhodozyma*), cujo pigmento carotenóide oxigenado (astaxantina) é amplamente utilizado em aquicultura e avicultura.

Palavras - chave: *Melia azedarach*, cinamomo, santa bárbara, *Azadirachta indica*, nim, *Aedes aegypti*, quitinogênese, controle biológico, astaxantina.

## ABSTRACT

### COMPARATIVE BIOACTIVITY BETWEEN *Melia azedarach* (chinaberry; "cinnamon") AND *Azadirachta indica* (neem) : LETHALITY AGAINST *Aedes aegypti* LARVAE

It has been registered 123.948 cases of dengue in Brazil during 2003. *Melia azedarach* ("cinnamon" or "santa bárbara") and *Azadirachta indica* (neem) are meliaceae plants originally from Asia with a promising future for pests phytocontrol and worldwide distribution, the first one being very common in the Brazilian territory. They display bioinsecticide properties through the feed deterrence and blocking insect growth what includes the outstanding step of chitinogenesis, namely the formation / regeneration of the insect exoskeleton during the moult (ecdysis). Ethanolic, methanolic, and chloroformic-methanolic extracts from ripen fruit kernels were used in the biological control of *Aedes aegypti*, hampering the evolution of larvae till the adult phase imposing their death. Similar extracts from Nim were assayed, too, normalizing the total solids concentration of all extracts but in a less toxic solvent, ethanol, also used in the controls. In these lethality assays to the dengue mosquito the explored parameters were then the concentration of bioactives from both meliaceae (separately), the temperature range (25°C or 30°C), and the larvae feeding or not (standard fodder) during the time course of the action of the natural phytopesticides. Readings were carried out after 48 h for the determination of LC<sub>50</sub>, LC<sub>95</sub>, and LC<sub>99</sub>. Results obtained with *M. azedarach* ("cinnamon") are original and the respective LC(s), promising as follows: LC<sub>50</sub> 0.035g% and 0.059% at 25°C, respectively obtained with the ethanolic extract / with feeding and with the chloroformic-methanolic extract / without feeding, the latter in coincidence with the first one in the case of larvae feeding. The most polar extract, methanolic, resulted in a even more marked lethality rate with a LC<sub>50</sub> of 0.014g% at 25°C, without feeding, comparatively to a LC<sub>50</sub> of only 0.0043g% when the temperature was raised to 30°C, this result being the most effective amongst all. Data obtained for the LC<sub>50</sub> from *A. indica* (neem) were in accordance with the bibliographic references and, on average, below the data herein obtained with *M. azedarach* ("cinnamon"), except for Neem ethanolic extract LC<sub>50</sub> 0.017g% at 30°C in the case of fed larvae. Aiming at a more rational and preservation-based exploration of the botanical source "cinnamon" -- attaining a mechanism of social inclusion for small communities under the risk of dengue fever -- namely, a integrate use of the collected fruits, the pulp around (mesocarp) was used, successfully, for the culture of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly, *Phaffia rhodozyma*), whose oxygenated carotenoid pigment (astaxanthin) is widely employed in fish farming and poultry.

Key words: *Melia azedarach*, "cinnamon", "santa bárbara", *Azadirachta indica*, neem, *Aedes aegypti*, chitinogenesis, biological control, astaxanthin.

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas estão presentes no planeta muito antes do surgimento do homem. E desde que este começou a desenvolver suas habilidades tem feito uso das plantas para diversos fins.

Atualmente, mesmo com o grande avanço tecnológico das indústrias químico-farmacêuticas, as plantas não perderam seu destaque; pelo contrário, sua utilização com propósitos medicinais continuam em ampla expansão. Os vegetais apresentam grande interesse por serem produtos naturais e freqüentemente são utilizados para o tratamento de várias enfermidades dentro do dito conhecimento popular, nisto nada diferindo das práticas fitoterápicas ou até mais modernamente, nutracêuticas, também. Mediante essas crenças e práticas se estimula o interesse de pesquisadores na complexa e por vezes completamente desconhecida gama de medicamentos disponíveis no reino vegetal.

De relevante interesse têm-se a família Meliaceae, que apresenta duas espécies amplamente estudadas e com princípios bioativos de importância econômica e social. Por um lado mais profundamente a *Azadirachta indica* A. Juss conhecida mundialmente como Nim ou Neem e por outro, a *Melia azedarach* L. popularmente chamada de cinamomo, santa barbára, jasmim-de-caiena, árvore santa, lírio-da-índia e ainda chinaberry tree.

O Nim apresenta grande importância econômica, devido à produção do óleo de sementes que contém grande quantidade do composto **azadirachtina**, um limonóide ou *nor*-triterpenóide com relevante ação repelente e inseticida e, portanto, com alto valor de comercialização. Esta árvore foi oficialmente introduzida no Paraná através do IAPAR –PR em 1986, há, hoje, alguns cultivos intensivos (MARTINEZ, 2002).

O cinamomo é uma árvore originária da China, Índia e Paquistão. É muito utilizada pelos indianos devido às propriedades medicinais. Esta árvore foi trazida da Ásia e distribuída pelas regiões tropical e subtropical, da América e da África. A santa bárbara, outra denominação para o cinamomo, por ser da mesma família do Nim apresenta limonóides com estruturas e propriedades semelhantes, o que pode viabilizar também seu uso como pesticida e sua exploração comercial.

Os mosquitos são os vetores mais importantes na transmissão de doenças tropicais na América Latina e no mundo. De 1950 - 1970 a dengue foi considerada rara na América do Sul, mas nas últimas décadas houve uma expansão global dessa enfermidade. Nos últimos anos houve o recrudescimento da dengue e da dengue hemorrágica, que são transmitidas por *Aedes (Stegomyia) aegypti*, o mosquito da dengue.

Em razão do rápido desenvolvimento de resistência a inseticidas por parte dos mosquitos e dos problemas resultantes do uso de tais produtos, de síntese química, para o meio ambiente, métodos alternativos de controle têm sido pesquisados, entre eles, incluem-se os extratos de sementes da *Meliaceae Nim*.

É do conhecimento científico divulgado que *Azadirachta indica* apresenta azadirachtina a qual atua exercendo uma ação inibitória sobre o hormônio juvenil, ecdisona, impedindo o desenvolvimento do estágio adulto de insetos.

Se comprovada a atividade dos princípios bioativos de *Melia azedarach* L. sobre os mosquitos, reprisando aquela já constatada para o Nim, a primeira pode se converter em alternativa mais factível em território brasileiro, pois os plantios de Nim são ainda incipientes na maioria das unidades da federação ou de pequena escala como em São Paulo e Goiás. O grande apelo advirá da exploração de produtos naturais sem conseqüências negativas paralelas para o homem ou ambiente, ou seja, dentro do que a ciência mais humanitária e menos ávida de ganhos fáceis recomenda como política comunitária e social.

## 2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliação comparativa dos princípios bioativos de *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss com vista ao controle da morfogênese de insetos, especialmente contra *Aedes (Stegomyia) aegypti*;

Objetivos específicos:

- Extração dos princípios bioativos;
- Fracionamento e purificação parcial dos princípios bioativos de maior intensidade;
- Avaliação preliminar da citotoxicidade dos princípios bioativos destas Meliáceas através do teste de letalidade de náuplios de *Artemia salina* (BSLT - Brine Shrimp Lethality Test);
- Aplicação prática mediante exploração da toxicidade e distúrbio na morfogênese do mosquito *Aedes aegypti*;
- Diferenciação das espécies produtoras de limonóides por Reação em Cadeia Polimerase (PCR);
- Produção de astaxantina, um carotenóide oxigenado de interesse biotecnológico para aqüicultura e avicultura, utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* e a de polpa de frutas de *Melia azedarach*, um subproduto na obtenção de limonóides.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A.Juss

#### 3.1.1 Origem

As espécies botânicas mais promissoras para serem usadas como plantas inseticidas pertencem as famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Amnonaceae, Labiataea e Canellaceae (CHAMPAGNE et. al., 1992), com destaque para as meliáceas, na qual estão *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss (MORDUE e BLACKWELL 1993, RODRIGUEZ e VENDRAMIM 1996). A *Azadirachta indica* A. Juss é considerada atualmente importante planta inseticida em todo mundo. Embora menos estudada, *Melia azedarach* L. também tem sido referida como tendo atividade inseticida (BRUNHEROTTO e VENDRAMIM 2001).

A *Melia azedarach* L.(FIGURA 3.1) considerada uma árvore ornamental, muito comum nos jardins da Espanha no século passado, hoje não apresenta tanta freqüência de ocorrência. Originária da China, Índia e/ou Paquistão, foi introduzida nas regiões do mediterrâneo.



FIGURA 3.1: *Melia azedarach* L.

FONTE: Professor J. D. Fontana, LQBB- Departamento de Farmácia, UFPR; outubro 2001.



O aspecto geral dos frutos de *Melia azedarach* (Cinamomo; Santa Bárbara), folhas e flores desta espécie em comento difere da seguinte espécie analisada, nesta, sobretudo no quesito fruto. As árvores possuem folhas pecioladas, bi-tripinadas. Flores reunidas pequenas, lilazes quando em botão. Quando abertas apresentam pétalas brancas e tubo violáceo a roxo-escuro. Fruto arredondado amarelo-escuro quando maduro (KLEIN, 1984) (FIGURA 3.2).



FIGURA 3.2: PARTES BOTÂNICAS DE *M. azedarach*

Também conhecida como Chinaberry tree, é empregada como planta medicinal pelas populações indianas (SRIVASTAVA 1986).

*Azadirachta indica* A. Juss tem reconhecimento secular em função de suas muitas propriedades veterinárias e médicas. De primária importância é sua potencial propriedade inseticida (SCHOEDER e NAKANISHI 1987). O nim, nome popular, é uma árvore perene originária da Índia e Paquistão e foi largamente distribuída e pode ser encontrada nas áreas tropicais e subtropicais de outras partes do mundo (NAT et al. 1989).

*Azadirachta indica* apresenta aspecto geral diferente da *M. azedarach*. As flores apresentam-se pequenas de coloração amarela clara, no entanto, também



estão reunidas. Os frutos são alongados e amarelo-claros quando maduro (FIGURA 3.3).



FIGURA 3.3: PARTES BOTÂNICAS DE *A. indica*

### 3.1.2 Classificação Taxonômica

Segundo Engler:

Divisão	Angiospermae	Angiospermae
Classe	Dicotyledoneae	Dicotyledoneae
Subclasse	Archichlamydeae	Archichlamydeae
Ordem	Rutales	Rutales
Família	Meliaceae	Meliaceae
Gênero	<i>Melia</i>	<i>Azadirachta</i>
Espécie	<i>Melia azedarach</i>	<i>Azadirachta indica</i>

### Segundo Cronquist:

Divisão	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Subclasse	Rosidae	Rosidae
Ordem	Sapindales	Sapindales
Família	Meliaceae	Meliaceae
Gênero	<i>Melia</i>	<i>Azadirachta</i>
Espécie	<i>Melia azedarach</i>	<i>Azadirachta indica</i>

(JOLY, 1987; CRONQUIST, 1988).

### 3.1.3 Constituintes químicos

As árvores da família Meliaceae apresentam uma grande quantidade de compostos bioativos e muitos deles já foram isolados e pelo menos parcialmente caracterizados. De *Melia azedarach* L. se isolou flavonóides com gliconas do tipo arabinose, ramnose e rutinosídeo. (MARCO et al. 1985)

Meliáceas são plantas que apresentam um grande número de princípios amargos que foram isolados e classificados como limonóides (KUMAR, SRINIVAS e YAKKUNDI, 1996). Foi relatada a ocorrência de um limonóide glicosídico a exemplo do que ocorre com a salanina e meldenina; o açúcar envolvido é a ramnose (SRIVASTAVA 1986).

A azadirachtina, o componente mais ativo da *Azadirachta indica* A. Juss, aparece de várias formas na literatura no que tange aos métodos de isolamento. Utilizando sementes de nim pode se fazer uma extração com hexano seguida de etanol 95%, sendo o etanol particionado com éter de petróleo e este com metanol 95%. Desta última se resgata o que é solúvel em acetato de etila para adsorção fracionante em coluna de sílica gel e finalmente as frações separadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC). O material cristalizado acompanhado de impurezas foi finalmente levado à purificação final mediante cromatografia pela variante "flash" (camada filtrante sob pressão), conduzindo finalmente a azadirachtina pura, com fórmula  $C_{35}H_{44}O_{16}$  (SCHROEDER e NAKANISHI 1987).

*Azadirachta indica* A. Juss (mais rica em azadirachtina) e *Melia azedarach* L. apresentam também outros compostos, por vezes mais facilmente isoláveis de outras partes botânicas, um deles foi obtido com a casca dessas árvores, a gedunina. Esse composto foi cristalizado de metanol e a fragmentação por espectrometria de massa gerou o íon molecular correspondente à fórmula  $C_{28}H_{34}O_7$  (KHALID, DUDDECK e GONZALES-SIERRA 1989). *Melia azedarach* L. teve vários outros compostos isolados, incluindo a vanilina e o ácido vanílico (HAN et al. 1991).

Extensas investigações dos constituintes terpênicos da casca da raiz de nim levaram ao isolamento do nimbilina, um tetratriterpeno e da nimolinina, um diterpeno tricíclico. A nimbilina apresentou fórmula molecular de  $C_{42}H_{50}O_{10}$  e o nimolinina de  $C_{20}H_{28}O_3$  (ARA et al. 1989).

Alguns peptidioglicanos e polissacarídeos também foram identificados em cascas de *Azadirachta indica* A. Juss (NAT et al. 1989).

A partir de folhas de nim, sem haste previamente secas, moídas até pó, obteve-se o nimbolide e o 28-deoxonimbolide (KIGODI et al. 1989). Também com as folhas verdes de nim se isolou dois compostos amargos, o nimocinolide e isonimocinolide, experimento que de seus frutos frescos isolou meliacina e nimocina (SIDDIQUI et al., 1986).

Do fruto maduro de *Melia azedarach* L. foi extraída uma protease; esta enzima, melaina provavelmente de uma glicoproteína. Para esse procedimento foram utilizadas quatro etapas incluindo o HPLC/ CLAE e filtração em gel (KANEDA et al. 1994).

Muitos limonóides tem sido isolados da família Meliaceae. *Azadirachta indica* A. Juss e a *Melia azedarach* L. apresentam interesse considerável, particularmente pelas suas propriedades inseticidas. Os limonóides do cinamomo são muito sensíveis em presença de pequena quantidade de ácido. Foi necessário o uso de técnicas especiais de separação tais como a cromatografia "flash" e cromatografia líquida de alta resolução para obtenção de seis limonóides. A amostra utilizada foi de casca de raiz de *Melia azedarach* L. e foram identificados vários compostos, entre eles trichilinas B e D, e ainda meliatoxina  $A_2$  (NAKATANI et al. 1994). O mesmo grupo interessado na propriedade inseticida do Cinamomo utilizou as cascas da raiz e obteve um composto denominado azedarachina C, o qual foi isolado por uma

combinação cuidadosa da utilização normal e de fase reversa da cromatografia líquida de alta resolução (HUANG et al. 1995).

*Melia azedarach* L., tal qual o nim, apresenta considerável interesse pela presença de várias substâncias químicas com atividade biológica. Com o extrato de étereo de casca de raiz de cinamomo, utilizando flash cromatografia, e cromatografia líquida de alta resolução semipreparativa normal e fase reversa isolou-se dois limonóides, de nomes salannal e meliacarpinina E (HUANG et al. 1996).

O nim tem recebido muita atenção nos últimos anos, graças às suas muitas propriedades, mas especialmente pela notável propriedade inseticida da substância azadirachtina encontrada no cerne da semente. Contudo, o composto não é facilmente separado dos muitos outros componentes de estrutura e polaridade similar. A análise da azadirachtina foi realizada pelo método cromatográfico usando detecção em ultra-violeta. O problema foi reconhecer o pico de azadirachtina dentre as muitas absorções, distinguindo-a dos demais componentes. Os doze triterpenóides mais polares presentes no nim foram isolados por coluna cromatográfica e onze deles identificados espectroscopicamente. O comportamento cromatográfico desses compostos foi determinado por sistema de fluido supercrítico (SFSC) e cromatografia líquida de alta resolução (CLAE/ HPLC) (JOHNSON e MORGAN, 1997).

Utilizou-se uma metodologia de fluido supercrítico para extração de azadirachtina A de caroços de nim. Usou-se dióxido de carbono como agente extrator em três estágios de separação supercrítica. As amostras foram analisadas por HPLC e LC/MS. E estes métodos se mostraram eficientes para quantificação de azadirachtina A extraída por fluido supercrítico (AMBROSINO et al, 1999). Desenvolveu-se também um método de análise rápido e sensível para monitoramento de azadirachtina e outros triterpenóides obtidos de nim (SHAAF et al., 2000; JOHNSON e MORGAN, 1997).

Da casca de raiz de cinamomo se isolou outros quatro limonóides, 4 methoxymeliacarpininas. O extrato etanólico da casca de raiz foi suspendida em água e particionado com diclorometano e *n*-butanol, sucessivamente. O extrato com diclorometano foi submetido a uma coluna cromatográfica de sílica gel eluída com *n*-hexano e acetato de etila em sistema de gradiente. E cada composto finalmente isolado por cromatografia líquida de alta resolução (TAKEYA et al. 1996a).

Com base em diferentes partes botânicas de *Melia azedarach* L. se obteve três extratos: flores, frutos maduros e folhas. Nos extratos de folhas e frutos separaram-se os compostos terpenóides e esteroides, terpenóides glicosídicos e alcalóides (MAREGGIANI, LEICHACH e LANER 1998; BOHNENSTENGEL, et al., 1999). Fraxinellona e fraxinellonona também são outros dois limonóides isolados da *Melia azedarach* (NAKATANI et al. 1998).

Alguns limonóides como a fraxinellona e fraxinellonona, mesmo parcialmente degradados, retém ainda atividade biológica (NAKATANI et al. 1998).

Outros dois limonóides da família das meliacarpininas, estruturalmente assemelhados a azadirachtina também foram isolados da casca da *Melia azedarach*. O extrato metanólico da casca foi fracionado por cromatografia em sílica gel. Uma das frações ativas foi submetida à coluna cromatográfica de sílica gel e octadecil sílica gel, e finalmente purificada por cromatografia líquida de alta resolução (FUKUYAMA et al. 2000).

*Azadirachta indica* A. Juss (nim) apresenta uma grande reputação e tradição na medicina popular asiática. De suas folhas foi possível a extração de nimocinol e meliacinol, dois triterpenóides tetracíclicos. Foi preparado um extrato metanólico das folhas e particionado com solventes, seguido de purificação usando cromatografia líquida e sucessivas cromatografias em camada delgada preparativas (SIDDIQUI et al. 2000).

#### 3.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Kary Mullis na década de 80, foi um marco na genética molecular, pois tornou possível a produção de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA sem a necessidade de clonar estes segmentos (ALBERTS et. al., 1994). A PCR explora as características da duplicação do DNA e consiste em desnaturar o DNA genômico, submetendo-o a uma alta temperatura e, deste modo, permitindo que as duas fitas simples originadas sejam duplicadas. Nisto se necessita a utilização de uma DNA polimerase (Taq polimerase) extraída de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) que habita locais quentes e cuja enzima suporta temperaturas de até 94°C, sendo que a sua temperatura ótima é de 72°C. Esta característica permite que o processo seja realizado em

aparelho termociclador com programas preestabelecidos de ciclagem (WATSON et al., 1992; ALBERTS et. al., 1994).

A técnica consiste do preparo de uma mistura formada por dois correagentes: “primers” e os quatro nucleotídeos doadores (adenina, timina, citosina e guanina) que são acrescentadas em cada tubo contendo a amostra do DNA a ser amplificado, além do catalisador, a Taq polimerase. Este DNA é exposto a 94°C por 5 minutos, para permitir que as duplas fitas separem-se. Neste instante, reduz-se a temperatura (37°C a 55°C), permitindo a hibridação dos iniciadores específicos (“primes” mais doadores) às fitas simples. Em seguida a temperatura é elevada para que a Taq polimerase atinja o seu ponto ótimo de atividade (72°C). Assim, o ciclo está completo e o próximo será iniciado com o aumento da temperatura para 94°C (WATSON et. al., 1992; ALBERTS et. at., 1994).

Vários tipos de marcadores moleculares podem ser usados para detectar mudanças genéticas e relacionar espécies entre si ou seu parentesco com espécimes de mesmo gênero ou família. Os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ou “Polimorfismo do DNA amplificado ao Acaso”, descrito por WELSH, McLELLAND (1990) e WILLIAMS et al.(1990), constituem ferramentas úteis na análise genética, sendo utilizados na obtenção de “impressões digitais” genômicas de indivíduos e populações. A técnica de RAPD provou ser útil para este propósito devido a habilidade de analisar variação de DNA usando pequena quantidade de tecido (WILLIAMS et al. 1990; NAYAK, et. al. 2003; ZAMBRANO et. al., 2003)

Técnicas de RAPD foram utilizadas para avaliação de marcadores de intra-populações de variação genética de *Azadirachta indica* A. Juss. Avaliação da diversidade genética demonstrou ser um meio eficiente e efetivo de estimar a variação genética e delinear uma relação fenotípica. O estudo sugeriu que existe um alto nível de variação genética em intra-populações indianas de nim (SINGH et.al., 2002). Na UFPR, o trabalho pioneiro como a técnica PCR- RAPD foi utilizado para diferenciar bactérias do solo aptas a degradar inulina até difrutose - anidrido (FONTANA et.al., 1994).

### 3.1.5 Atividade biológica

O extrato de raiz de *Melia azedarach* L. já foi testado contra o parasita *Schistosoma mansoni*. O extrato etanólico 70% previamente liofilizado e ressuspendido em solução de cloreto de sódio 0,9% foi injetado intraperitonealmente em ratos. Esses ratos foram previamente infectados com cercária de *Schistosoma mansoni*. O extrato mostrou-se eficaz, a produção de ovos do parasita reduziu após o tratamento, mas a dose não foi suficiente para o completo impedimento da ovigênese (CAN - XI 1984).

Tomando-se as folhas do nim contra a malária, seu extrato foi avaliado quanto a atividade anti-malária usando *Plasmodium berguei* em ratos. Por quatro dias com dose oral de 500mg/kg, o extrato metanólico mostrou uma contenção parasitária estatisticamente significativa (ABATAN e MAKINDE, 1986; CHAMPAGNE et al., 1992).

A partir de *Azadirachta indica* A. Juss obteve-se um extrato aquoso de suas raízes que apresentou uma atividade inibitória na via de ativação do complemento tanto pela via clássica com pela alternativa. A purificação desse extrato envolveu muitos passos. E a seqüência produziu dois polímeros, um com alta atividade e de baixo peso molecular e o outro de baixa atividade e alto peso molecular (NAT et al., 1989).

O efeito do extrato aquoso de folhas de *Melia azedarach* L. no complemento humano e em leucócitos polimorfonucleares, ambos componentes do sistema imune, foi descrito. O extrato mostrou uma forte atividade anticomplemento, e não afetou a atividade fagocítica dos leucócitos polimorfonucleares (BENENCIA et al., 1994).

O tratamento neonatal de ratos com um fator antiviral obtido de folhas de cinamomo, os protegeram contra encefalite letal causada por vírus (ANDREI et al., 1986). O extrato cru de folhas verdes e frescas desta mesma espécie contém um fator antiviral capaz de inibir a replicação viral em vários animais (ANDREI, COTO e TORRES, 1985; ANDREI et al., 1988; DECALZO e COTO, 1989; WACHSMAN e COTO, 1995; WACHSMAN, CASTILLA e COTO, 1998; CASTILLA et al., 1998).

O nimbolide e o dexionimbolide são compostos isolados da *Azadirachta indica* A. Juss. Essa duas estruturas foram avaliadas quanto à atividade citotóxica em presença de células cancerígenas. Foram testadas em carcinoma de nasofaringe,

câncer de pulmão, de cólon. O nimbolide apresentou maior citotoxicidade do que o outro composto. Apesar disso, ambos demonstraram atividade citotóxica com todas as linhagens de células testadas (KIGODI et al., 1989; TAKEYA et al., 1996b; CHAMPAGNE et al., 1992).

Após a ingestão de frutos maduros de cinamomo por cachorros, observaram-se sinais clínicos de envenenamento. Mesmo com tratamento emergencial os cachorros não sobreviveram mais de 36 horas depois do início dos sinais clínicos de envenenamento (HARE et al., 1997; CHAMPAGNE et al., 1992).

Alguns extratos de plantas, ou suas combinações ativas isoladas possuem ação inseticida aguda ou crônica como reguladores de crescimento ou redutores da alimentação de espécies de insetos (SHAPIRO, ROBERTSON e WEBB, 1994). Insetos tratados ou alimentados com azadirachtina apresentam inibição de crescimento, morte de larvas durante o processo de ecdise, alongamento da fase larval, deformações de pupas e adultos, redução na longevidade, fecundidade e fertilidade de adultos, até a morte dos insetos horas após o tratamento (MORDUE e BLACKWELL, 1993; KARNAVAR e DLAMINI, 1998).

Em resposta a utilização maciça dos agrotóxicos na agricultura traçou-se um paralelo entre a aplicação de produtos naturais e sintéticos no meio ambiente, suas conseqüências nos diversos ecossistemas tanto quanto o efeito deletério que alguns agentes provocavam nos animais. A contaminação do meio ambiente, e os efeitos das substâncias organocloradas em espécies úteis e não alvo foram descritas, particularmente devido ao uso irrestrito destes. Os produtos naturais têm sido investigados para que possam vir a substituir as substâncias sintéticas. Pesquisas e desenvolvimento de técnicas nesta área indicam a azadirachtina, uma substância natural extraída principalmente de *Azadirachta indica* A. Juss, como uma grande alternativa para o controle dos insetos indesejáveis. Embora esta planta não seja originária do Brasil, investigações do potencial inseticida do extrato de *Melia azedarach* L. se direcionam para esta substituição. Resultados demonstraram que em baixas concentrações do extrato etanólico bruto do cinamomo, provocou a morte de 50% dos insetos adultos de formigas saúvas em um tempo de exposição pouco maior que três horas (PERTILE, 1995).

Um triterpenóide isolado da *Melia azedarach* induziu uma importante atividade inseticida sob larvas de *Spodoptera liturais* (MACLEOD et al., 1990) e o seu extrato



aquoso também apresentou atividade em larvas de *Spodoptera frugiperda* (RODRIGUEZ e VENDRAMIM, 1996 e 1997). O efeito do extrato metanólico de cinamomo em larvas de *Thaumetopoea pityocampa* foi estudado em condições de laboratório. As larvas foram alimentadas com ramos tratados com concentrações variadas de extrato. O claro efeito redutor da alimentação pode ser observado com o aumento da concentração de extrato. A concentração de apenas de 1% do extrato foi efetivo para se obter 100% de mortalidade (BREUER e DEVKOTA, 1990).

O extrato metanólico de folhas e raízes de *Azadirachta integrifoliola*, *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* foram comparados em testes com insetos. A causa da mortalidade nos insetos ocorreu durante a metamorfose, induziu também defeitos morfogenéticos em adultos. O extrato de folhas de *Azadirachta integrifoliola* apresentou um resultado superior de *Melia azedarach* L. Os sintomas causados pelo extrato de *Azadirachta integrifoliola* em larvas e pupas foi idêntico ao de *Azadirachta indica* A. Juss e *Melia azedarach* L. (SCHMUTTERER, 1989).

A mariposa do tubérculo da batata, *Phthorimaea operculella*, é reconhecida como a mais séria e destrutiva praga da batata na República do Yemem. As mariposas foram tratadas com extrato aquoso da polpa de cinamomo. A mortalidade provocada foi de 91.6% (NASSEH e AL – FURASSY, 1992).

As propriedades inseticidas dos limonóides da *Melia azedarach* L. já foram testadas. Essa importante atividade foi avaliada contra um inseto comum no Japão, *Spodoptera exigua*. (NAKATANI et al., 1994). A azadirachtina também inibiu a alimentação dessa larva (HUANG et al., 1995). Outros compostos do cinamomo como a melicarpinina E também apresentou potente propriedade inseticida contra larvas de *Spodoptera eridania* (HUANG et al., 1996). Limonóides degradados de cinamomo apresentaram também atividade biológica; essa propriedade foi avaliada contra larvas de *Spodoptera littoralis* e *Oryzias latipes* (NAKATANI et al., 1998).

O tratamento de folhas de outras plantas úteis com extrato etanólico de frutas de *Melia azedarach* L. em diferentes concentrações foi usado para a alimentação do besouro *Xanthogalleruca luteola* e causou um aumento na mortalidade das larvas de besouro com o aumento da concentração. As larvas que foram aspergidas com o extrato não foram afetadas na sua sobrevivência e desenvolvimento (VALLADARES et al., 1997).

Um estudo foi conduzido para avaliação da toxicidade de extrato de cinamomo contra alguns acarídios, *Tetranychus urtica* e *Stethorus gilvifrons*. O extrato metanólico apresentou maior eficácia no índice de mortalidade seguido pelos extratos em acetona e com éter de petróleo (ISMAIL, 1997).

O efeito do extrato metanólico de frutos de *Melia azedarach* L. foi avaliado no desenvolvimento de duas pragas do Egito, *Spodoptera littoralis* e *Agrotis ipsilon*. Diferentes concentrações do extrato foram incorporadas no alimento das larvas. Em ambas observou-se uma significativa redução no seu desenvolvimento (SCHMIDT et al., 1998).

A fasciolose, causada pela *Fasciola hepática*, um protozoário cujos hospedeiros são caracóis. Acarreta sérias perdas econômicas em várias regiões do Brasil. Entre as alternativas de controle usou-se o extrato de vegetais e a avaliação do extrato do suco de frutas e sementes de *Melia azedarach* L. no controle da *Lymnae cubensis*, o principal vetor da fasciolose em Cuba. Várias concentrações do extrato foram testadas determinando a dose média e máxima letal. Observou-se considerável efeito na frequência cardíaca dos moluscos. Os resultados foram animadores para demonstrar o potencial do uso dessa planta no controle dos moluscos indesejáveis (PEREZ et al., 1998).

Os extratos de frutos e folhas de cinamomo foram testados com o intuito de comprovar as propriedades repelente e inseticida contra ovos e ninfas de *Triatoma infestans*, o vetor da doença de Chagas. O extrato do fruto verde apresentou maior ação repelente para as ninfas. O fruto maduro teve um fraco efeito enquanto o das folhas foi ineficaz (VALLADARES et al., 1999; CHAMPAGNE et al., 1992).

A aplicação de extrato de folhas e frutos do cinamomo no milho promoveu uma redução do número de larvas de *Busseola fusca*. Com isso ocorreu uma diminuição nos níveis de infestação das folhas e os danos causados por esta larva na haste do milho (GEBRE e AZEREFEGNE, 1999).

O extrato etanólico de frutos maduros de *Melia azedarach* L. mostrou atividade fungistática e fungicida contra os seguintes fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Candida albicans* agentes causadores de onicomioses e *Microsporium canis* um dos agentes causadores da tinea tonsurante ou micose do couro cabeludo (CARPINELLA et al., 1999; CHAMPAGNE et al., 1992).

Foram realizados estudos com extrato de fruto de cinamomo em várias condições para verificar a sua eficácia. O desenvolvimento da lagarta, *Thaumetopoea proceSSIONea* L., foi monitorada em árvores pequenas de carvalho vaporizadas com um produto comercial de nim 0,5% e extrato de *Melia* 1%. O resultado foi comparado com as árvores controle. Depois de uma semana, diferenças claras puderam ser observadas no experimento. O desenvolvimento das larvas nas árvores vaporizadas foi retardado. A larva permaneceu pequena e pareceu estar quieta e inativa. O efeito depois da aplicação direta no caule não foi tão drástico quanto aquele vaporizado, mas 100% de mortalidade foi atingida com um período de quatro semanas (BREUER e DE – LOOF, 1998).

A partir das sementes e dos frutos de cinamomo obteve-se um extrato metanólico que mostrou forte atividade na redução da alimentação de larvas de *Sesamia nongrioides*, uma praga do milho nos países mediterrâneos. O extrato da semente mostrou maior bioatividade. A atividade do extrato da semente na maior dose foi comparável com a azadirachtina pura (JUAN, SANS e RIBA, 2000).

Comparou-se a bioatividade de extratos aquosos a 3% de três meliáceas, *Melia azedarach* L., *Trichilia pallida* Swartz e *Azadirachta indica* A. Juss, em relação a mosca branca, *Bemisia tabaci* biótipo B, criada em tomateiro. No primeiro experimento os extratos foram aplicados sobre ovos e ninfas com três dias de idade, avaliando-se a mortalidade e a duração das fases de ovo e de ninfa. No segundo os extratos foram aplicados apenas sobre ninfas, avaliando-se a mortalidade nessa fase e a longevidade e fecundidade dos adultos. Em relação à fase do ovo, o extrato de *Trichilia pallida* foi o que provocou maior mortalidade, seguindo-se os de *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* L. A maior mortalidade ninfal foi constatada com o extrato de *Azadirachta indica* A. Juss, seguindo-se os de *Trichilia pallida* e *Melia azedarach*. Nenhum dos extratos afetou a duração das fases de ovo e de ninfa, assim como a longevidade e fecundidade (SOUZA e VENDRAMIM, 2000; SOUZA e VENDRAMIM, 2001).

A *Bemisia tabaci* é um dos insetos mais danosos que atacam o campo. O extrato de frutos e folhas de cinamomo foi testado contra adultos. O extrato de frutos foi avaliado contra ovos, ninfas e pupas do inseto. Os tratamentos incluíram extratos aquoso, metanólico e acetônico de 200mg/ml e diluições seriadas 20 e 2mg/ml. A mortalidade foi avaliada em 6, 7 e 8 dias depois do tratamento dos ovos, ninfas e

pupas, respectivamente. Os resultados da preferência desse hospedeiro indicaram um baixíssimo número de insetos nas folhas de cinamomo em comparação com folhas de feijão, pepino e tomate depois de 24 horas. Isso indicou que *Melia azedarach* L. não é bom hospedeiro para o inseto. Adultos do inseto foram significativamente repelidos dos tomateiros tratados com extrato não diluído quando comparado com o controle depois de 72 horas. Existiu grande diferença no percentual de mortalidade das ninfas quando expostas ao extrato não diluído comparado com os outros extratos e com o controle. Assim o extrato das folhas de *Melia azedarach* L. foi descrito como repelente para os adultos, enquanto que o extrato das frutas mostrou efeito prejudicial contra as ninfas (HAMMAD et al., 2000a). Os extratos aquosos de frutos e sementes de cinamomo foram testados quanto à sua eficácia *versus* outros inseticidas sintéticos, contra a larva da ervilha, *Liriomyza huidobrenis* Blanchard. O estudo incluiu um experimento de campo no qual a *Beta vulgaris* var. *cicla* L. foi naturalmente infestada e um experimento em estufa na qual o pepino foi infestado artificialmente. Outros tratamentos incluindo azadirachtina, óleo mineral ultrafino, abamacetina, ciromazina, imidacloprid, pirazophos e controle. Os resultados experimentais de campo indicaram que o extrato do fruto de *Melia* e outros inseticidas reduziram bastante o número de larvas na beterraba comparativamente os controles. Entretanto, dez dias depois da segunda pulverização, o extrato do fruto não diferiu significativamente do controle, mas seu efeito foi comparável com os inseticidas, exceto abamacetina e ciromazine. Nos experimentos na estufa, a larva de ervilha foi observada em alta densidade nas folhas do pepino localizadas na parte baixa da planta comparada com as posições das outras folhas. O extrato do fruto e os outros inseticidas diminuíram o número de larva nas folhas do pepino comparada com o controle. Em certos períodos do experimento a eficiência do extrato de *Melia* foi comparável aos inseticidas comerciais e sintéticos (HAMMAD, NEMER e KAWAR, 2000b).

O microcamarão de salinas (*Artemia salina*) foi desenvolvido como um conveniente método para um teste (BST; *brine shrimp test*) para fracionamento na descoberta e monitoramento da atividade biológica de produtos naturais. Este teste particularmente apresenta correlação positiva com a atividade inseticida. O extrato metanólico de raízes de *Melia azedarach* L. exibiu importante atividade letal (FUKUYAMA et al., 2000).

Os extratos aquosos de *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss também foram testados contra a *Plutella xylostella*, considerada a principal praga do repolho. Folhas de couve foram submersas em extrato de cinamomo e de nim, secos ao ar livre, inoculados com doze larvas recém eclodidas de *Plutella xylostella* e então mantidas em placas de Petri. As avaliações foram realizadas a cada dois dias, e se renovando a alimentação envenenada. A duração da fase larval foi alongada em 3,5 dias pelo extrato aquoso de cinamomo e proporcionou 96,7% de mortalidade. O extrato de nim ocasionou a mortalidade total das larvas. (TORRES, BARROS e OLIVEIRA, 2001; KUMAR et al., 1999; CHEN et al., 1996; DILAWARI, SINGH e DHALIWAL, 1994).

A traça do tomateiro, cientificamente chamada de *Tuta absoluta*, pode ocasionar grandes perdas na produção de tomate. O extrato aquoso de cinamomo foi avaliado sobre o seu desenvolvimento. Para tal, as lagartas foram alimentadas desde a eclosão com folhas de tomateiro tratadas com extrato de *Melia azedarach* L., avaliando-se a duração e viabilidade das fases larval e pupal. O extrato das folhas provocou a redução da sobrevivência larval. Todas as estruturas vegetais do cinamomo empregadas nas formas de extratos aquosos provocaram a redução de sobrevivência larval, com exceção daquele preparado com frutos maduros. As pupas provenientes de lagartas alimentadas com folhas de tomateiro tratadas com extrato de folhas de cinamomo apresentaram período de desenvolvimento mais longo do que aquelas oriundas da testemunha e do tratamento com frutos maduros. Das quatro estruturas vegetais testadas, a maior eficiência foi constatada com o extrato de folhas, vindo a seguir, em ordem decrescente de atividade inseticida, os extratos de frutos verdes, ramos e frutos maduros. Apesar da variação do efeito dos extratos em função da estrutura vegetal testada, de modo geral todas afetaram negativamente o desenvolvimento do inseto, o que sugere que os princípios ativos presentes na *Melia azedarach* L. estão distribuídos nas suas diversas partes botânicas, embora em concentrações variáveis (BRUNHEROTTO e VENDRAMIM, 2001).

Há efeito do extrato aquoso de nim e cinamomo na sobrevivência dos ovos, larvas, ninfas e fêmeas adultas de *Mononychellus tanajoa*, o ácaro da mandioca verde. O extrato de nim causou mortalidade de até 60% dos ovos, 100% em larvas,

ninfas e fêmeas adultas. O extrato de Cinamomo provocou a morte de até 7,5% nas fêmeas adultas (GONÇALVES et al., 2001).

Os extratos aquoso ou metanólico de caroços de nim apresentaram atividade contra larvas de quarto instar de *Aedes aegypti* provocando morte larval (ZEBITS, 1984). As folhas de *A. indica* quando maceradas com água não exibiram atividade contra nenhum dos estágios larvais de *A. aegypti* (ZARROUG et al., 1988). Outra pesquisa que utilizou três quilos de folhas de nim e também procedeu à extração com água obteve a determinação das CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em 24 e 48 horas quando testadas contra larvas de terceiro e quarto instar deste mosquito (MONZON et. al., 1994 e DZUL, et. al., 2002).

### 3.2 Dengue

A população humana e a espécie *Aedes aegypti* dos mosquitos *Aedes* sp têm interagido nas Américas por muitos séculos. A América Latina é área importante dessa interação, na qual o mosquito se disseminou através dos anos. O maior problema para a população humana deriva da habilidade do mosquito de se tornar vetor de vários vírus e seus sorotipos capazes de produzirem doenças epidêmicas em humanos, particularmente a febre amarela e a dengue.

A distribuição do mosquito continua a ser instável porque todas as áreas que se declararam livre do mosquito estão sujeitas a reinfestação devido à persistência da população de *A. aegypti* em outros lugares circunvizinhos (FIGURA 3.4) (SLOSEK, 1986).

Embora o *A. aegypti* possa ser encontrado longe de aglomerados humanos, em algumas áreas do Velho Mundo, sempre ligado ao peridomicílio e ao domicílio humano, sendo encontrado nos locais de maior concentração humana e raramente em ambientes semi-silvestres ou onde a densidade da população humana esteja reduzida.

Esta espécie foi introduzida no Brasil no período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos. Devido a sua importância como vetor da febre amarela, foi intensamente combatido, tendo sido considerado erradicado em 1955. Contudo os outros países da América do Sul e Central não o erradicaram. Esse descuido provocou a re-invasão do Brasil, em Belém do Pará, em 1967, no estado

do Rio de Janeiro, provavelmente em 1977 e em Roraima no início da década de 1980. A espécie está presente em: Estados Litorâneos, do Maranhão ao Paraná, e da Região Centro – Oeste, além de Minas e Tocantins (CONSOLI e LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994).

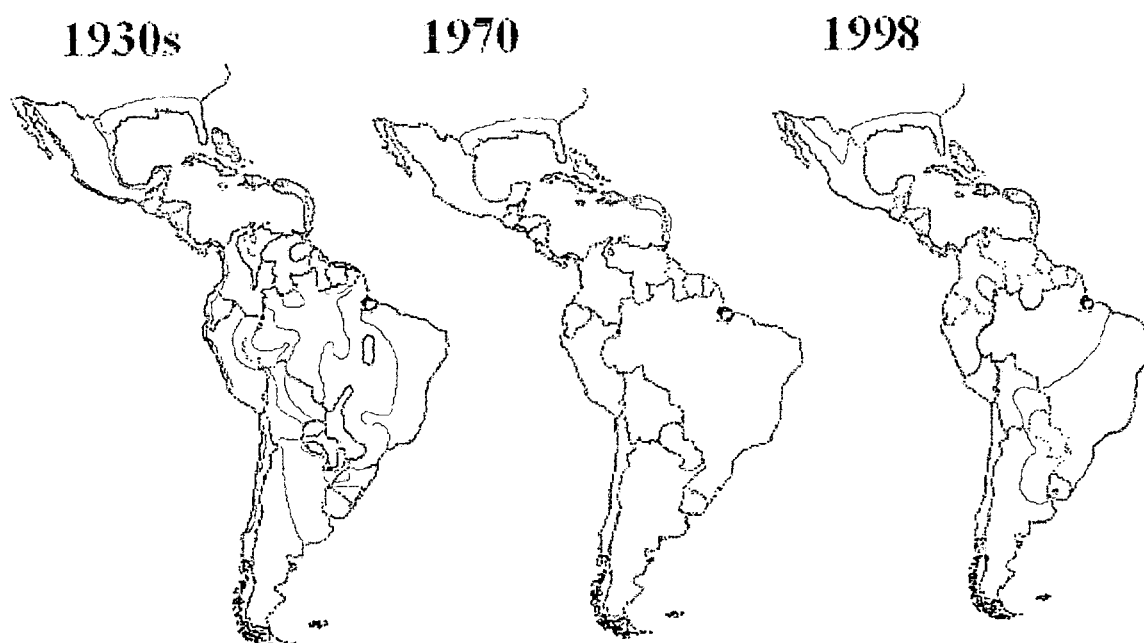


FIGURA 3.4: Reinfestação de *A. aegypti* no continente Americano

A incidência global da dengue tem crescido assustadoramente nas últimas décadas. A doença é agora endêmica em mais de 100 países, com mais de 2,5 bilhões de pessoas em riscos, na África, nas Américas, no oeste do Mediterrâneo, sul e leste da Ásia e oeste do Pacífico. No Brasil em 1998 foram relatados 234.828 casos nos primeiros quatro meses, representando 60% dos casos nas Américas, foram previstos 406.206 casos em 2001 no continente. Em 2002 no território brasileiro foram notificados, 560.000 casos e no início de 2003 se registrou 123.948 casos (WHO, 2003; PHO, 2003). Os fatores responsáveis pelo ressurgimento dessa epidemia são: crescimento demográfico descontrolado (acarretando um aumento da deterioração da água potável, um mau planejamento urbano), a diminuição do controle dos mosquitos em áreas endêmicas; aumento de densidade de *Aedes*

*aegypti* em centros urbanos; a modernização dos meios de transportes com aumentos de viagens aéreas para países tropicais e pode-se acrescentar ainda a resistência aos inseticidas mais utilizados (BROWN, 1986; MAZZARRI e GEORGHIOU, 1995; RAWLINS, 1998; GLUBER, 1998, 2002; MACORIS et al., 1999; WIRTH e GEORGHIOU, 1999; RODRIGUEZ et al., 1999; HEMINGWAY e RANSON, 2000; CAMPOS e ANDRADE, 2001 e GUZMÁN e KOURI, 2002).

### 3.2.1 *Aedes (Stegomyia) aegypti*

As coleções aquáticas onde ocorre o desenvolvimento das fases do ciclo morfogênético do mosquito são conhecidas em epidemiologia pelo nome de *criadouros*. Neles processa-se a oviposição e a subsequente morfogênese, até a formação dos adultos. Assim sendo, tanto os ovos como as larvas e pupas ocupam o mesmo ambiente. Isto graças a seus eficientes mecanismos de se desenvolver nos mais variados ambientes de água doce. Esta notável capacidade de adaptação às situações as mais diversas, traduz-se atualmente pela multiplicidade de processos de oviposição, de crescimento embrionário, de eclosão e de desenvolvimento das formas imaturas. Tudo isto permite resultados favoráveis de sobrevivência ao meio modificado pelo homem (FORATTINI, 2002a).

Os criadouros preferências para o desenvolvimento de imaturos de *A. aegypti* são os recipientes artificiais, tanto os abandonados por ações antrópicas a céu aberto e preenchidos pelas águas das chuvas, quanto àqueles utilizados para armazenar água para uso doméstico. Esses criadouros são representados principalmente por: pneus, latas, vidros, cacos de garrafas, tonéis, latões e cisternas destapadas ou mal tapadas, ou mesmo os lagos artificiais. Criadouros pequenos correspondem aos locais mais comuns, somente com a condição de que a água armazenada seja pobre em matéria orgânica em decomposição e acumulada em locais sombreados de fundo ou paredes escuras (CHIARAVALLOTI, 1997; FORATTINI et al., 1997).



### 3.2.1.1 Características das formas e o ciclo biológico

O volume de postura das fêmeas varia de 50 a 500 ovos, depositando-os em locais passíveis de serem inundados, ou que permitam à larva atingir facilmente a água, ou ser por esta atingida. Para tanto, são escolhidas horas do dia de baixa luminosidade. Logo após a oviposição, os ovos podem sofrer um aumento de volume, na dependência de vários fatores, principalmente da temperatura, supondo-se que se deva à absorção de água. O período de desenvolvimento embrionário, que corresponde à incubação dos ovos, depende de vários fatores do meio. De qualquer maneira corresponde a poucos dias. Assim, sabe-se que seus ovos permanecem viáveis por vários meses fora da água, sendo então chamados de “mosquitos da cheia”.

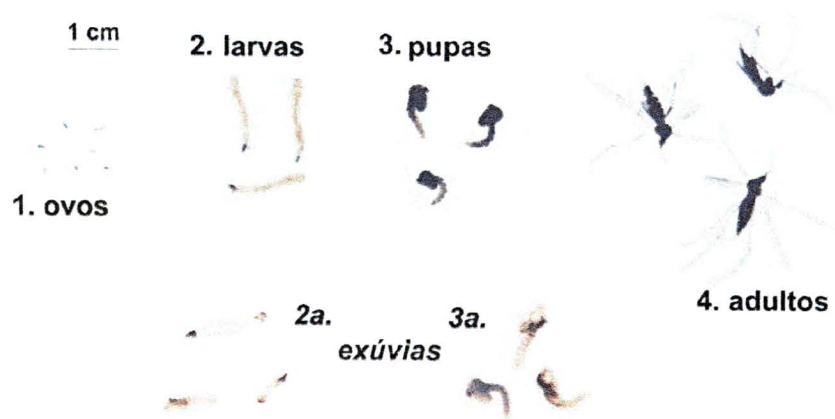
A fase larvária compreende quatro estádios que são essencialmente aquáticos e de vida livre, além de serem dotados de grande mobilidade. Desde o momento da eclosão a forma larval está adaptada ao meio natural do criadouro onde foi realizada a postura dos ovos. O sistema respiratório das larvas de *A. aegypti*, as obrigam de maneira mais ou menos permanente, a permanecerem na interface ar/água, ou então, a freqüentarem a superfície com certa assiduidade. Tem-se admitido que as larvas de mosquitos adquirem os alimentos mediante filtração, esse método de ingestão dos alimentos é conhecido como processo *filtrante*.

A duração dos quatro estádios larvais não é a mesma, embora o crescimento seja contínuo ao se considerar o conjunto deles. Pondo-se de lado as variações específicas, pode-se dizer que o segundo e o terceiro são mais breves do que o primeiro e que o mais longo corresponde ao quarto. Entende-se disso o fato de que no último estágio são dadas as transformações orgânicas que resultam na formação do adulto. Em linhas gerais e em condições normais, a duração de todo o período de desenvolvimento larval varia ao redor de 8 a 10 dias.

O próximo estágio é representado pela pupa que também se desenvolve em ambiente aquático. Corresponde ao período de transição em que ocorrem profundas transformações que resultam na formação do adulto e na conseqüente mudança do meio hídrico para o terrestre. A fase de pupa dura cerca de dois dias, ou pouco mais, ocorrendo então a ecdise pupal e a liberação do adulto (FIGURA 3.5 e 3.6).

Os mosquitos adultos machos procuram substâncias açucaradas como néctar de flores, o orvalho, as frutas. E as fêmeas têm o hábito de sugar sangue fenômeno que se designa hematofagia. Tal necessidade está ligada ao desenvolvimento do patrimônio de ovos uma vez que estes não se desenvolveriam sem os produtos resultantes da digestão do sangue ingerido (HOTCHKIN, 1985; FORATTINI, 2002b).

Um fenômeno muito peculiar dos mosquitos e especialmente de *Aedes*, é a referida ecdise ou liberação de exúvias. Tanto na fase larval quanto na pupal, o animal experimenta crescimento, ou seja, aumento de volume das partes moles, o que não é possível acomodar dentro do mesmo e rígido exoesqueleto de quitina. Este vestuário polissacarídeo é então descartado e substituído por outro que se ajusta então ao tamanho do corpo. São etapas, pois de intensa biossíntese de quitina. Os limonóides inibem esta biossíntese. Esta é então a base estratégica desta dissertação de mestrado.



**FIGURA 3.5: Ciclo Morfo-genético de *A. aegypti***

FONTE: Prof. J. D. Fontana, C. B. Wandscheer – LQQB – Laboratório de Químio  
Biotecnologia de Biomassa, Prof. M. A. N. Da Silva, J. E. D. Luna – LEMV –  
Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, 2003.

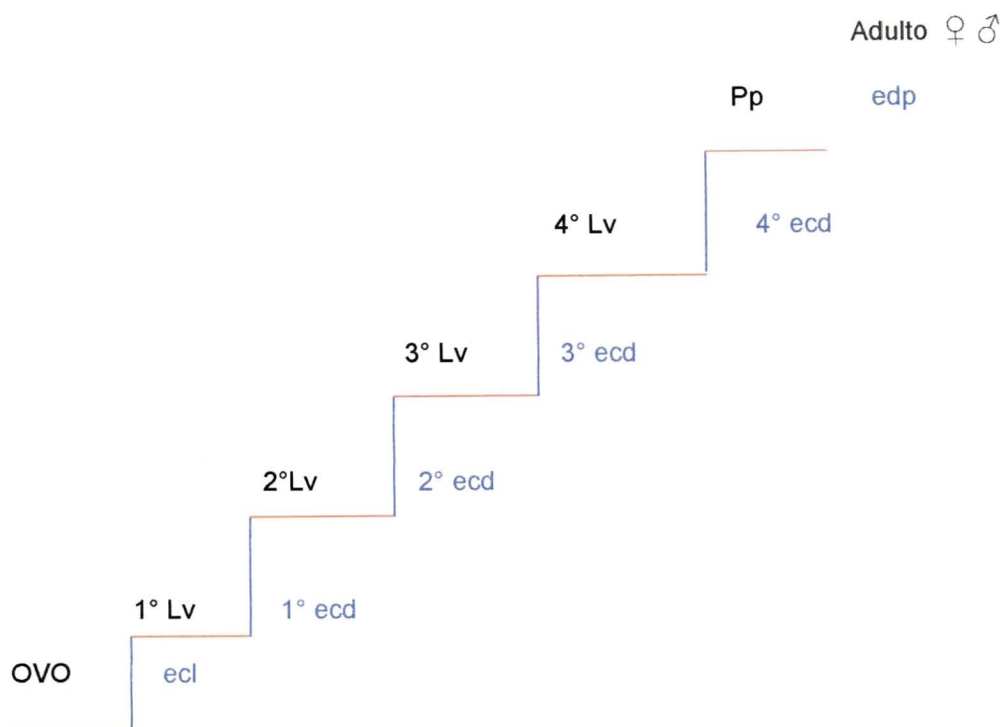


FIGURA 3.6: Esquema do Ciclo Morfogênético de *A. aegypti*

NOTA: ecl: eclosão; ecd: ecdise; edp: ecdise pupal; Lv: estágio larval; Pp: estágio Pupal.

FONTE: FORATTINI, 2002a.

### 3.3 ASTAXANTINA

#### 3.3.1 Ocorrência

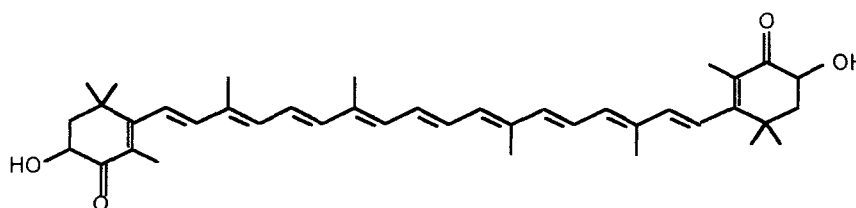
A astaxantina é um pigmento carotenóide roseo-alaranjado, e é encontrado no meio marinho, provavelmente originário de algas verdes do subfilo *Chlorophyceae*, tal como a microalga *Haematococcus pluvialis* (JOHNSON e AN, 1991; VÁZQUEZ e MARTIN, 1998), e pequenos crustáceos como o camarão (*Pandalus borealis*) e o krill (*Euphansia pacifica*) (JOHNSON e AN, 1991). Estes organismos compõem uma cadeia alimentar que leva à pigmentação de animais maiores, incluindo salmonídeos (JOHNSON e AN, 1991), animais invertebrados tais como lagostas (*Homarus gammarus*), caranguejos, e até pássaros tais como o flamingo e o guará

brasileiro (AN, 2001; JOHNSON e AN, 1991; REYNDERS, RAWLINGS e HARRISON, 1996).

Alguns outros microrganismos que sintetizam a astaxantina são as bactérias *Mycobacterium lacticola* e *Brevibacterium* (MEYER e PREEZ, 1994) e alguns fungos basidiomicetos do gênero *Peniophora* (ACHEAMPONG e MARTIN, 1995). A levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* antes *Phaffia rhodozyma* tem sido objeto de estudos nos últimos anos em vista de sua considerável produção de pigmentos carotenóides, em especial a astaxantina. Diversos aspectos da biotransformação de astaxantina têm sido enfocados no LQQB – Laboratório de Químio- Biotecnologia de Biomassa da Universidade Federal do Paraná.

### 3.3.2 Propriedades químicas

A astaxantina, 3,3'-diidroxi- $\beta,\beta$ -caroteno-4,4'-diona (1), é um oxicarotenóide (xantofila) com a fórmula molecular  $C_{40}H_{50}O_4$  e uma massa molecular de 596,86 g/mol. A astaxantina cristalina se apresenta na forma de um pó fino de coloração violeta-marrom escuro, o qual, em soluções diluídas de solventes orgânicos, aparece como róseo-alaranjado.



(1) astaxantina

A astaxantina é sensível à luz, calor, ácidos, bases e oxigênio, e sua destruição química ou enzimática pode ocorrer durante o processo de extração a partir de amostras biológicas. A astaxantina sob a forma de solução deve ser estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e acondicionada em atmosfera inerte, para excluir o oxigênio. O vácuo, ou atmosfera de nitrogênio, ou argônio são geralmente utilizados. Estes cuidados têm a finalidade de evitar a sua oxidação pelo ar atmosférico (SCHIEDT e LIAAEN-JENSEN, 1995). Todavia, seu grau de oxigenação natural a faz mais

estável do que outros carotenóides como o beta-caroteno (cenoura) e licopeno (tomate). Como a astaxantina é biossintetizada e armazenada intracelularmente, se dá um mecanismo natural de proteção contra fatores ambientais.

### 3.3.3 Emprego da astaxantina

A aplicação mais importante da astaxantina é na aquicultura de elevado valor comercial de peixes, tais como salmão e truta, e na criação de crustáceos, como lagosta e camarões (STOREBAKKEN e NO, 1992). Um fator primordial que afeta o consumo, a aceitação e o preço final de salmonídeos ou crustáceos é a coloração da carne ou carapaças. A cor rosa natural da carne do salmão e do exoesqueleto de crustáceos é devido à presença de pigmentos carotenóides, principalmente a astaxantina. Na criação de salmonídeos e crustáceos em cativeiro, é necessário um alimento que contenha astaxantina para obter a pigmentação adequada (BONFIM, 1999).

Segundo TORRISSEN e CHRISTIANSEN (1995), a astaxantina pode servir como precursor de vitamina A em algumas espécies de peixes e crustáceos, ou pelo menos como hormônio de fertilização e promotor de crescimento (SIGURGISLADOTTIR, 1994).

A astaxantina também é vastamente utilizada na avicultura, visando aumento na produção e coloração de carne de frango e gema de ovos (DIKE, LETTNER e ZOLLITSCH, 1992; BONFIM, 1999). Quando incorporada na alimentação de aves, a astaxantina da dieta foi relatada como fator melhorador da produção de ovos e da saúde geral das galinhas (LIGNELL, 1998). O aumento percentual de eclosão dos ovos, da resistência à infecção por *Salmonella* e da vida de prateleira dos ovos também são atribuídos à alimentação suplementada com astaxantina (LIGNELL, 1998). Os produtores mundiais de alimentos para peixes e aves domésticas utilizam entre 40 e 60 toneladas/ano de corantes carotenóides sintéticos cantaxantina e astaxantina. O uso destes pigmentos sintéticos em rações para peixes contribui aproximadamente 10 a 15% no custo total do alimento (MEYER, PREEZ e KILIAN, 1993; MEYER e PREEZ, 1994).

Enquanto os efeitos positivos da astaxantina nas criações de aves, peixes e crustáceos tem sido reconhecidos há anos, o benefício como poderoso antioxidante

para a saúde humana tem sido revelada nos últimos anos (AQUATEC, 2001). Segundo FONTANA et al. (2000), a astaxantina apresenta capacidade 250 vezes superior em combater os radicais livres (como por exemplo, espécies ativas do oxigênio) do que o  $\alpha$ -tocoferol.

### 3.3.4 Características gerais

*Xanthophyllomyces dendrorhous* é uma levedura basidiomiceta, com células vegetativas elípticas, com dimensões que variam de 3,8 a 7,5 por 5,5 a 10,5  $\mu\text{m}$ , e podem ocorrer isoladas, em pares ou, ocasionalmente, em cadeias curtas. Não apresentam micélio verdadeiro, mas podem apresentar um feixe de células ou pseudomicélio rudimentar, que consiste de um número limitado de células em cadeia (MILLER, YONEYAMA e SONEDA, 1976).

Os critérios utilizados na identificação desta levedura imperfeita como basidiomiceto, incluiu-se o modo de formação do broto, a estrutura da parede celular, a natureza dos polissacarídeos que fazem parte das cápsulas das leveduras, sua habilidade de sintetizar pigmentos carotenóides e propriedades metabólicas, como a capacidade de utilizar a uréia. As características principais de identificação de *Xanthophyllomyces dendrorhous* são a presença de xilose e ramnose em polissacarídeos extracelulares e a síntese de astaxantina intracelular (GOLUBEV, 1995).

A biossíntese da astaxantina em cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* parece ter início na fase de crescimento exponencial e permanece durante a fase estacionária (ACHEAMPONG e MARTIN, 1995). Isto está de acordo com a descoberta de JOHNSON e LEWIS (1979), que determinaram que a produção de astaxantina está associada ao crescimento, mas que a sua formação não coincide exatamente com o aumento da biomassa. Tem sido relatado que mesmo na ausência da glucose, a concentração de xantofilas continua a aumentar (JOHNSON e LEWIS, 1979). Isto pode ser explicado pelo fato de *Xanthophyllomyces dendrorhous* excretar um intermediário carbônico durante o crescimento, por exemplo, ácido acético, um álcool ou um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, o qual é reassimilado posteriormente e estimula a carotenogênese (JOHNSON e AN, 1991).

### 3.3.4 Cultivo

Poucos trabalhos estão disponíveis a respeito do cultivo industrial de *Xanthophyllomyces dendrorhous* quando se tem em conta o aproveitamento de fitobiomassa residual e alguns autores têm estudado vários métodos de produção com o objetivo de desenvolver um método de cultura industrial de baixo custo. O cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* em fermentadores é caro quando comparado com outros cultivos de leveduras, uma vez que é necessário fermentações por um longo período de tempo (aproximadamente 5 ou 6 dias) a temperatura que não exceda 25°C. Quantidades consideráveis de astaxantina podem ser produzidas após o término da fase de crescimento da levedura. Uma boa capacidade de resfriamento e aeração do meio são requisitos importantes, o que eleva o custo de produção (JOHNSON e AN, 1991). Assim, a utilização de fontes alternativas, de baixo custo, para o cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* seria uma opção de reduzir o gasto da produção industrial.

*Xanthophyllomyces dendrorhous* pode ser produzida sem grandes despesas, usando muitos sucos, abundantes nos países Mediterrâneos, ou a partir de material cru. Esses sucos vegetais, sem nenhum tratamento posterior ou adição química, são excelentes substratos para o crescimento da levedura e produção da astaxantina (CALO e GONZALES, 1995). Do mesmo modo, é comum o uso de resíduos, obtidos do processamento de alimentos, como substrato para o cultivo de microrganismos. Eles apresentam a vantagem de produzir uma biomassa útil, além de ajudar a aliviar os problemas de poluição com os depósitos de resíduos.

FONTANA et al. (1996) relataram os primeiros resultados empregando o caldo de cana-de-açúcar como fonte de carbono (aproximadamente 175 g de sacarose por litro de caldo fresco), suplementado com uréia e fosfato de sódio, obtendo um aumento do conteúdo de astaxantina e do rendimento celular.

FONTANA (2002) e PASSOS (2002) utilizaram a fécula da mandioca como alternativa para o cultivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* e bioprodução de astaxantina. Descreveram que o ácido fosfórico, diluído e termopressurizado, foi testado com sucesso como ácido alternativo ao ácido clorídrico para depolimerização da pasta concentrada de amido de mandioca até glucose e maltoligossacarídeos, e este hidrolisado fosfórico demonstrou ser uma excelente

fonte de carbono utilizado em meio de cultivo para o crescimento da levedura e bioprodução de astaxantina. A neutralização do catalisador ácido com o hidróxido de amônio, gerando fosfato de amônio, proporcionou condições adequadas para o crescimento e produção de astaxantina na levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, assim os três requisitos nutritivos básicos de fermentação foram satisfeitos, ou seja, fontes de carbono, nitrogênio e fósforo.

*Xanthophyllomyces dendrorhous* pode utilizar uma variedade de fontes de carbono, incluindo mono e dissacarídeos. VÁZQUEZ, SANTOS e PARAJÓ (1997) testaram a glucose, a xilose e a sacarose como fonte de carbono, para o crescimento de *Xanthophyllomyces*. Estes carboidratos podem ser obtidos em grande escala, respectivamente a partir do amido, materiais lignocelulósicos, beterraba e cana-de-açúcar. Inexiste registro na literatura para o emprego de polpa de frutos de meliáceas na produção de pigmentos carotenóides, um dos objetivos específicos desta dissertação. No intuito de ampliar a base de sustentação tecnológica do projeto como um todo, contemplando uma visão contemporânea de maior inclusão social incorporativa da participação de qualquer pequeno agricultor.

### 3.3.6 Aplicações da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*

A levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* é um suplemento de dieta promissor para o cultivo de peixes, camarões e frangos em virtude de ser uma fonte natural de astaxantina e uma fonte alternativa de proteína ("Single Cell Protein", SCP) (HAARD, 1988). As leveduras também fornecem outros nutrientes necessários para o crescimento dos animais, isto é, ácidos graxos insaturados; vitaminas.

O alto conteúdo de lipídeos de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (JOHNSON, LEWIS e GRAU, 1980) e seu conteúdo de carotenóides que são precursores da astaxantina podem melhorar comercialmente o aroma e a cor de peixes e crustáceos cultivados com mais eficiência do que outros aditivos alimentares sintéticos. Os consumidores podem preferir produtos carotenóides naturais a pigmentos sintéticos, devido às regulamentações rigorosas com relação à segurança de produtos químicos como aditivos de alimentos e a pouca absorção de carotenóides sintéticos comparados com os de fontes biológicas (FANG e CHENG, 1993).



Diante do acima exposto, nota-se a relevância do estudo de *Melia azedarach* para o fitocontrole do mosquito *Aedes aegypti*. A facilidade de procriação do referido mosquito no território brasileiro é um incentivo para o desenvolvimento de pesquisas com soluções alternativas para o seu controle e, em consequência, para diminuir os casos de dengue, da qual o mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor.

A iniciativa em se empregar o caroço do fruto de *Melia azedarach* se deu em razão da sua farta disponibilidade nas regiões sul e sudeste, apesar de não ser uma planta nativa do Brasil.

A pesquisa fundamentou-se em métodos simples de extração dos compostos ativos, principalmente, de limonóides. Houve, também, a necessidade de estabelecer uma destinação para a polpa do fruto que durante o processo se acumulava em grande quantidade. Portanto, desenvolveu-se o cultivo da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* para a produção de carotenóides utilizando como substrato a polpa aquosa do fruto de *Melia azedarach*.

Todas as metodologias empregadas, dentre elas: cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, reação em cadeia pela polimerase, teste de letalidade de náuplios de *Artemia salina* e bioensaios com larvas de *Aedes aegypti*; tiveram por objetivo traçar um paralelo de rendimento do fitocontrole do mosquito pelas espécies *Melia azedarach* e *Azadirachta indica*, tendo em vista que esta já possui referências no combate de larvas de culicídae e aquela com resultados inéditos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

Exceto pelos ensaios de bioatividade com os mosquitos, todas etapas de materiais e métodos foram realizados no LQBB – Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa do Departamento de Farmácia da UFPR.

#### 4.1.1. Coleta de *Melia azedarach* L.

As amostras de *Melia azedarach* L. (cinamomo) foram coletadas de árvores pertencentes ao sistema de arborização da Prefeitura Municipal de Curitiba, no Bairro Cristo Rei em Curitiba, durante o mês de março de 2002, época correspondente à frutificação. Foram colhidos frutos verdes, frutos amarelos, frutos castanhos em ordem crescente de maturação.

#### 4.1.2. Caroços de *Azadirachta indica* A. Juss

A parte botânica utilizada de *Azadirachta indica* (nim) foi apenas o caroço (sementes), obtido do empresário Hércio Saraiva, do município de Campinas (SP). As sementes são lisas alongadas de cor creme. Foram trazidas também folhas desta espécie.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Preparação do extrato de *Melia azedarach* L.

Os frutos de *Cinamomo* podem ser separados em três categorias de acordo com o estágio de maturação, identificados pela coloração (frutos verdes, amarelos e castanhos). Neste trabalho foram utilizados somente os frutos maduros.

Trituram-se 50g de caroços de frutos castanhos no liquidificador, previamente martelados, utilizando como solvente extrator 150ml de álcool etílico absoluto, a frio, por período de 24 horas sob agitação e protegido da luz. Decorrido o tempo o material então foi filtrado usando filtro de placa porosa, malha M, revestida com

papel de filtro a vácuo. Estas quantias e proporções podem ser escalonadas a gosto, tendo em vista que o embrião responde, gravimetricamente, pela menor proporção.

Uma segunda extração é realizada com o resíduo, utilizando 50ml de etanol a frio. O extrato deve ser filtrado novamente e as duas frações das extrações podem ser juntadas para posteriores análises (MaEtOH).

Duas variantes extrativas foram realizadas, separadamente seguindo a mesma metodologia acima descrita, utilizando metanol ou uma mistura de solventes clorofórmio e metanol 1:1, com a finalidade de alterar a polaridade dos agentes extratores (MaMeOH e MaC:M).

#### 4.2.2.Preparação do extrato de *Azadirachta indica* A. Juss

Para a obtenção dos extratos de caroços e sementes de nim procedeu-se exatamente como descrito em 4.2.1. Computada a facilidade de que a característica da semente, semelhante ao pistache, favorece acesso muito mais fácil ao embrião.

#### 4.2.3. Concentração dos extratos

Os extratos preparados acima com os caroços de *Azadirachta indica* e de *Melia azedarach* passaram por processo de concentração em rotaevaporador (Laborota 4000 – efficient, Heidolph instruments, seguidos por processo em centrífuga a vácuo (Speedvac SC 100 – SAVANT) e posterior liofilização (Freeze Dryer 4.5 – Labconco) apresentando uma normalização de concentração final de princípios vegetais como resíduo seco de 200mg/ml, preferencialmente retomados em etanol absoluto (caso dos extratos etanólicos e clorofórmio-metanol) ou em DMSO - Dimetilsulfóxido (caso dos extratos metanólicos).

#### 4.2.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos diferentes extratos de caroços de *M. azedarach* L. e *A. indica* A. Juss

Os extratos acima descritos de *M. azedarach* e de *A. indica* foram analisados em CCD. Foram utilizadas cromatoplasas de sílica - gel 60 (MERCK). A corrida das

placas cromatográficas foi realizada com a mistura de solventes: éter etílico:acetato de etila (v/v) na proporção 52:48 como fase móvel e a revelação das bandas com solução de vanilina sulfúrica (1% de vanilina em etanol e ácido sulfúrico a 10% em etanol) seguida de aquecimento a 100°C por 3-5 min. Os padrões utilizados foram azedarachol, azadirachtina, azadirachtina semi purificada (AZA 16), meliacarpinina C, 3- deacetil salanin, 12 -*o*-acetil azedarachin B, amoorastin, azedarachin A, melianin B, compostos isolados de *M. azedarach* L. denominados pelos seguinte 1428 RT- 906 e 1428 RT- 919, e treoleína. As CCD foram observadas também em UV (365nm).

#### 4.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para os diferentes extratos *M. azedarach* e *A. indica*

As análises dos perfis de diferentes extratos *M. azedarach* L. e *A. indica* A. Juss feitas por CLAE foram realizadas em equipamento Shimadzu LC – 10 A VP, módulos SPD-M10A Diode Array Detector (DAD). A coluna utilizada foi uma Supelcosil™ LC- 18 (SUPELCO) de 25cm X 4,6mm, 5µm. A fase móvel utilizada foi acetonitrila:água na proporção 50:50, fluxo de 1,0 ml/min, pressão entre 1311-1337 psi e à temperatura ambiente. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL, injetados manualmente. O DAD leitura em 210nm foi utilizado para uma visão geral dos extratos. Os extratos foram diluídas 1:50 na fase móvel.

#### 4.2.6. Ensaio de bioatividade / citotoxicidade BST - Brine Shrimp (Lethality) Test

Dos extratos etanólicos acima descritos bem como dos extratos metanólicos totais de caroços de frutos de *A. indica* A. Juss e de *M. azedarach* L. foram utilizadas alíquotas entre 10 e 20 mg solubilizadas em 0,25 a 0,5 ml de dimetilsulfóxido. A partir dessas alíquotas foram preparadas diluições 1:5. Com base nas diluições de nim e de cinamomo foram preparados tubos com concentrações crescentes de 5, 10 e 20 µl aplicadas em água do mar (sintética) (FONTANA et. al, 1994) num volume total de 2 ml contidos em tubos de hemólise. Cada tubo recebeu 10 náuplios de *Artemia salina* recém eclodidos na mesma salina artificial. Cada ensaio foi

observado a cada intervalo de 6 horas até completar um período de 24 horas. Foram anotados eventos como redução da capacidade natatória dos náuplios até sua total imobilidade (tomada então como evento letal). Com isto se permite determinar a DL<sub>50</sub>.

#### 4.2.7. Ensaio de bioatividade em larvas de *Aedes aegypti*

Para realização dos bioensaios foram utilizados exemplares de *Aedes aegypti* mantidos no insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. A colônia de *A. aegypti* teve início em fevereiro de 2000 a partir de colônia mantida na UNICAMP, de linhagem obtida junto ao CDC (Center of Disease Control) de Porto Rico, colônia Rockefeller.

##### 4.2.7.1 Condições de manutenção da colônia de *Aedes aegypti*

Os mosquitos são mantidos em gaiolas cúbicas de metal medindo 45cm x 45cm, sendo seus lados, com exceção do fundo, revestidos por tela também de metal de 0,1cm de malha e providas de uma manga de tecido de algodão. Estas gaiolas permaneceram sujeitas à variação da luz natural, temperatura de 25°C ( $\pm 2,0^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa do ar de 80% ( $\pm 10\%$ ).

Os mosquitos adultos, no insetário, foram mantidos em gaiolas nas quais são colocados frascos de solução açucarada. A solução oferecida apresenta 10% de mel em água destilada, sendo renovada diariamente. Para alimentação sangüínea, foi introduzido nas gaiolas um rato do biotério da Universidade Federal do Paraná por períodos de 30 minutos uma vez por semana. Como recipiente de oviposição das fêmeas, no interior das gaiolas se colocam recipientes de vidro com capacidade de 120ml de água com papel filtro.

Após a eclosão, dos ovos, as larvas foram mantidas externamente às gaiolas em estantes teladas e alimentadas com ração para peixe TetraMin<sup>®</sup>. A ração TetraMin<sup>®</sup> possui os seguintes componentes de acordo com o fabricante: extrato de levedura, arroz integral moído, alimento de camarão, farinha de glúten, produtos de batata seca, farinha de aveia, farelo de soja, óleo de soja, óleo de peixe, alimento de

alga, sorbitol, lecitina, gelatina, corantes naturais e artificiais e etoxyquina como conservante. O produto comercial possui, em quantidades garantidas, proteínas (mínimo) 45%, gorduras (mínimo) 5%, fibras (mínimo) 2%, umidade (máxima) 6% e vitaminas 400µg/g. A ração foi fornecida em quantidade suficiente que permita o consumo adequado de alimento por larva durante todo o seu desenvolvimento.

#### 4.2.7.2 Bioensaios sob condições de Laboratório com espécimes de *Aedes aegypti* para determinação da suscetibilidade larval aos diferentes extratos preparados de *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss

A partir dos espécimes de *Aedes aegypti* mantidos no LEMV, se realizaram experimentos de suscetibilidade larval aos extratos etanólicos e clorofórmio: metanol suspendidos em etanol e dos extratos metanólicos em dimetilsufóxido (DMSO) de caroços de *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* A. Juss.

Os bioensaios foram realizados com as concentrações variando de 3,3 a 50mg/100ml dos diversos extratos. As larvas testadas foram as de terceiro instar tardio e quarto instar cedo. O período de exposição foi de 24, 48 horas com fotoperíodo de 12 horas, nas seguintes temperaturas: 25°C e 30°C. No primeiro teste não foi adicionado alimento para as larvas. E segundo bioensaio foi realizado nas mesmas condições anteriores, mas com adição de 10mg de alimento por pote.

Foram utilizados potes plásticos com capacidade de 320ml para cada ensaio. Os ensaios consistiram em cinco replicatas por concentração e suas testemunhas. Foram avaliadas cinco concentrações diferentes dos diversos extratos de ambas as espécies arbóreas para *Aedes aegypti*. Os copos plásticos foram preenchidos com 150ml de água mineral e adicionadas em cada um vinte larvas saudáveis e ativas de terceiro e quarto instars (FIGURAS 4.1 e 4.2). Em seguida foram pipetadas e rapidamente homogenizadas as concentrações desejadas de extratos e nos controles foram adicionadas quantidades respectivas de etanol e/ ou dimetilsufóxido (WHO, 1981 e 1982).

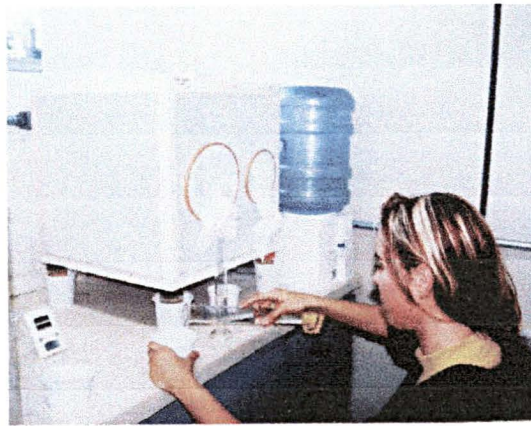


FIGURA 4.1: Preparo dos biensaaios



FIGURA 4.2: Incubadora onde foram realizados os bioensaaios a temperatura e luminosidade controlada.

#### 4.2.7.3 Análise dos resultados dos bioensaios

Para obtenção dos resultados e determinação dos valores de concentração letal e/ou diagnóstico correspondente à mortalidade de 50%, 95% e 99% das larvas, ou seja, respectivamente as  $CL_{50}$  e  $CL_{95}$  e  $CL_{99}$  no período de 48 horas se utilizou o programa de análises PROBIT (FINNEY, 1981).

#### 4.2.8 Diferenciação das espécies de Meliáceas por PCR – Polymerase Chain Reaction

##### 4.2.8.1 Extração de DNA de plantas

O DNA de plantas foi extraído de acordo com o protocolo modificado por DOYLE e DOYLE (1990). A metodologia foi adaptada de um método proposto por SAGHAI-MAROOF et al. (1984).

##### 4.2.8.2. RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*): procedimento

As reações de amplificação foram realizadas da seguinte forma: volume total da reação foi de 25 $\mu$ L, contendo 18 $\mu$ L de água miliQ; 2,5 $\mu$ L de tampão de enzima *Taq* DNA polimerase; 2mM de  $MgCl_2$ ; 50 $\mu$ M de cada nucleotídio dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 0,3 $\mu$ M de iniciadores (*primers* – Operon Technologies®); 50ng de DNA genômico e 1U (0,2 $\mu$ L) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®). Depois de preparadas, as reações foram cobertas com 10 $\mu$ L de óleo mineral (Sigma Chemical Co.).

As amplificações foram feitas em Termociclador Perkin Elmer 4.700. Uma desnaturação inicial a 94°C, durante 7 minutos; seguido de 45 ciclos de amplificação por 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 36°C para o anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão da *Taq* polimerase e incorporação de nucleotídeos; e extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Foram utilizados vinte primers de RAPD diferentes (OPA1 até OPA20), em amplificações de DNA das espécies *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Zea mays* L. (Milho).



Os produtos das amplificações foram analisados em gel de agarose a 1%, dissolvido em tampão TBE (1X). Para isto, 25µL de cada amostra amplificada foram misturadas a 3µL de tampão de carregamento (Ficoll – 10X) e aplicados no gel. A eletroforese foi realizada com voltagem constante de 98Vcm<sup>-1</sup>, por 1 hora e 40 minutos. O tampão de cuba usado foi o TBE (1X).

Os géis foram corados durante 20 a 25 minutos, por imersão em solução aquosa contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio e fotografados sob luz UV. Padrão de peso molecular λ (Fago lambda hidrolisado com enzima de restrição Fac RIII).

TBE – Tampão eletroforese

Tris base concentração de 89mM, Ácido Bórico 89mM e EDTA ph 8,0 a 2mM.

Ficoll

Ficoll (tipo 400) a 25%, Azul de bromofenol 0,25% e Xyleno cianol FF a 0,25%.

4.2.9. Produção de astaxantina utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* em extratos de polpa dos frutos maduros de *Melia azedarach* L.

4.2.9.1 Meio para manutenção de cepa

O meio de cultura utilizado para a manutenção de *Xanthophyllomyces dendrorhous* foi o descrito a seguir:

Glucose	1,0g
Maltose	1,0g
Em 50mL de água destilada	
Extrato de Levedura	0,1g
Peptona	0,5g
Em 50mL de água destilada	

Para solidificar o meio foram acrescentados 2X 1g de ágar. A esterilização foi feita em autoclave a 121°C e a 1 atm de pressão por 20 minutos, mantendo-se separados os nutrientes (açúcares; outros suprlmentos) até a hora da mistura e solidificação.

O meio de cultivo para o inóculo foi o mesmo descrito acima, retirando-se apenas o ágar.

#### 4.2.9.2 Preparo do inóculo

As células leveduriformes róseo-avermelhadas de *Xanthophyllomyces denrorhous* presentes no meio sólido de manutenção, utilizando uma alça, foram transferidas para frasco tipo Erlenmeyer de 125ml contendo 25ml de meio líquido para o inóculo incubadas em agitador rotatório a 200 rpm e 22°C. Decorridos 48 horas, o sobrenadante foi descartado e a biomassa celular foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos, as células foram então ressuspensas em 20ml de salina 0,9%. Com o auxílio de uma pipeta previamente esterilizada, foram transferidos 200µl para frasco de 25ml de água destilada um volume de suspensão de maneira a obter uma absorbância entre 0,2 e 0,3 a 650nm, que foi a concentração celular final para fins de inóculo em meio frasco.

#### 4.2.9.3 Preparo dos extratos de polpa de frutos de *Melia azedarach* L.

Extraiu-se a polpa de 1kg de frutos maduros de *Melia azedarach* com o 2 litros de água destilada, separados em alíquotas de 250ml para fins de congelamento. Desse material metade foi centrifugado em centrífuga refrigerada por 5 minutos a 8000 rpm, fornecendo um sobrenadante-S1 (polpa límpida), e um sedimento do extrato da polpa do fruto.

#### 4.2.9.4 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos iniciais de polpa de frutos maduros liofilizados de *M. azedarach* foram analisados em CCD. Foram utilizadas cromatoplasas de sílica - gel 60 (MERCK). A corrida das placas cromatográficas foi realizada com a mistura de solventes: acetona: acetonitrila: acetato de etila: 1-propanol: água na proporção de 5: 10: 5: 20: 10 como fase móvel e a revelação das bandas com 0,5% de orcinol em ácido sulfúrico:metanol (5:95) seguida de aquecimento a 100°C por 3-5 minutos. Os padrões utilizados foram ácido glucurônico, arabinose, arabinogalactose, galactose,

glucose, maltose, maltotriose, manose, rafinose, ramnose, estaquiose, xilose, xilobiose e xilotriose.

#### 4.2.9.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises do perfil dos açúcares do sobrenadante de polpa aquosa de fruto maduro de *Melia azedarach* feitas por CLAE foram realizadas em equipamento Shimadzu LC – 10 A VP, módulos RID 10A detector de índice de refração e SPD-M10A detector Diode Array detector (DAD). A coluna de troca iônica utilizada foi uma Aminex® HPX-87H da Bio-Rad. A fase móvel utilizada foi o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 8mM, fluxo de 0,5 ml/min e à temperatura ambiente. O volume de injeção das amostras foi de 20µl, injetados manualmente. O DAD leitura de 190nm foi utilizado para uma visão geral do sobrenadante. Os padrões utilizados para realização das curvas foram frutose e glucose.

#### 4.2.9.6 Cultivo da levedura *Xanthophyllomices dendrorhous*

O sobrenadante da polpa aquosa do fruto de *M. azedarach* (S1) foi previamente autoclavado. Durante o processo de autoclavação ocorreu a formação de um novo precipitado. Uma segunda centrifugação foi necessária, realizada em centrífuga refrigerada por 5 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante límpido (SL2) foi usado na formulação dos meios de cultivos de *X. dendrorhous*.

O experimento consistiu em seis ensaios diferentes em duplicata. No primeiro o novo sobrenadante límpido (SL2) foi diluído 1:2 e 1:5 respectivamente sem nenhuma complementação nutricional. Os cultivos 3, 4, e 5 foram realizados a partir do sobrenadante (SL2) diluição 1:5, igual ao cultivo 2, diferenciados apenas pela suplementação com 0,1% de fosfato de amônio monobásico, 0,1g/% extrato de levedura e 0,1g/% de uréia respectivamente. Um sexto cultivo, comparativo, foi realizado com 2g% de glucose suplementado com 0,1g% de extrato de levedura.

Os meios de cultivos foram autoclavados novamente, 121°C por 20 minutos. Os cultivos foram feitos em erlenmeyer de 125ml, contendo 25ml de meio e inoculados com 300µl de inóculo correspondente à absorbância final entre 0,2 e 0,3 em leitura a 650nm (turbidez celular).

Os cultivos foram mantidos em agitador orbital New Brunswick Scientific Co. Inc. (100rpm) com temperatura controlada de 20°C durante sete dias. Interrompido o cultivo, a medida da absorbância em 650nm é correlacionada com a medida gravimétrica da biomassa de células previamente centrifugadas. As células foram liofilizadas até peso constante e utilizadas para medida gravimétrica da biomassa e extração de astaxantina.

#### 4.2.9.7 Carboidratos redutores

Os carboidratos redutores foram determinados pelo método do 3,5 – dinitrossalicílico, descrito por MILLER (1959), usando-se a *D*- glucose como padrão, na faixa de 0,18 a 3,6 mg/ensaio, com volume de 10mL, leitura em 540nm, utilizando UV- 1650PC UV – Visible Spectrophotometer Shimadzu

#### 4.2.9.8 Doseamento de astaxantina

A metodologia foi a seguinte: triturar o “pellet” celular liofilizado com bastão de vidro; adicionado 2ml de dimetilsufóxido e deixado em repouso por 30 minutos; adicionado 6mL de acetona e homogeneizado; centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos; separar o sobrenadante e repetido o processo com o precipitado; juntar os sobrenadantes obtidos e adicionado 10ml de cloreto de sódio a 20%, 10ml de éter de petróleo e agitado; retirado à fase etérea e extraído a fase aquosa com mais 2X5ml de éter de petróleo; filtrado a fase etérea obtida por sulfato de sódio anidro; transferido para balão volumétrico de 25ml e completado o volume com éter de petróleo e finalmente medido a absorbância em 474 nm, utilizando éter de petróleo como branco. O teor de astaxantina foi calculado por regra de três conforme abaixo.

Contas:

1g astaxantina/100mL-----1600A  
 1µg astaxantina/mL -----0,16A  
 X µg astaxantina/mL ----- A<sub>amostra</sub>

X  $\mu$ g ----- 1 mL

Y  $\mu$ g ----- 25mL

Y  $\mu$ g ----- Z g(peso seco)

W  $\mu$ g ----- 1 g(peso seco ou célula seca)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cromatografia em camada delgada de diferentes extratos de *M. azedarach* e *A. indica*

Nos cromatografias abaixo pode-se cogitar a presença de alguns padrões nos extratos, mas em baixas quantidades. Como no caso da azadirachtina que esta presente nos três extratos diferentes de *Azadirachta indica* (FIGURA 5.6, 5.7 e 5.8).

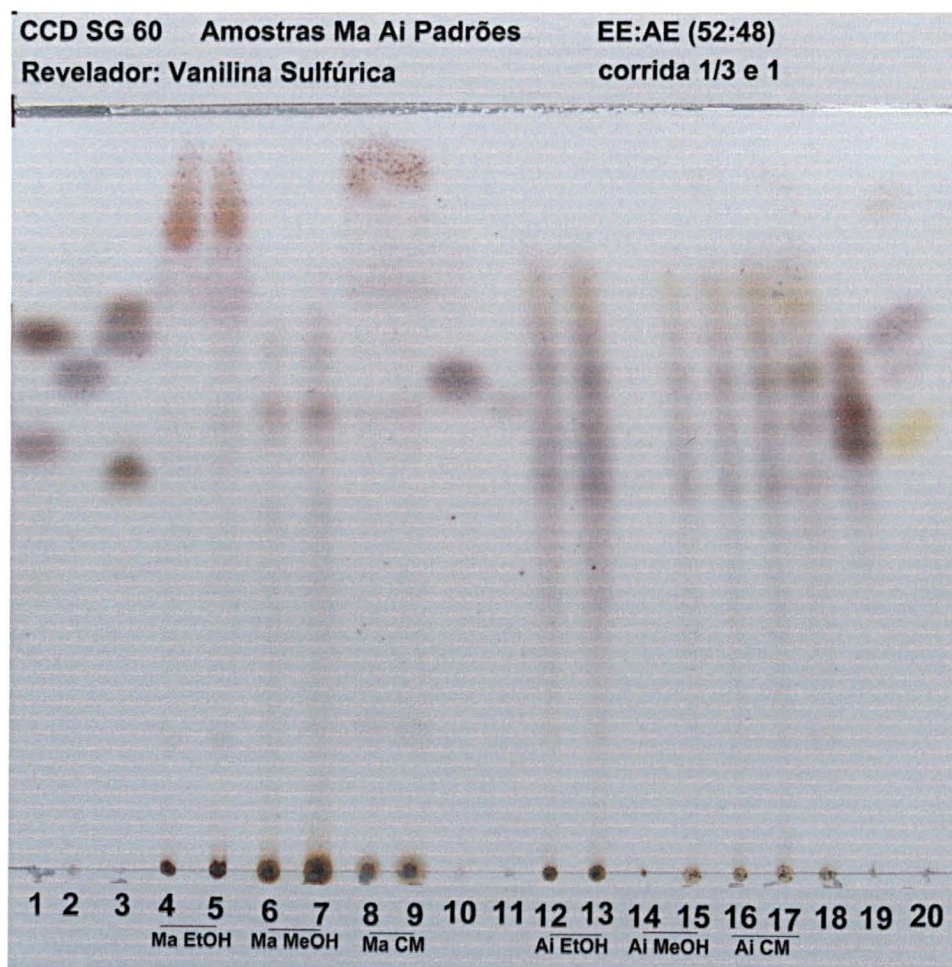


FIGURA 5.1: Cromatografia em camada delgada

NOTAS: Padrões: 1-azedarachol (rósea) e 1428- RT 919 (avermelhada), 2- 1428- RT 906, 3- acetil azedarachin, 3- deactil salanin, 10- meliacarpinina, 11- azadirachtina, 18- azadirachtina semi purificada (AZA 16), 19- amoorastin, 20- azedarachin A, melianin B (amarelo) e trioleína (superior). Amostras: *Ma*EtOH (4 e 5), *Ma*MeOH (6 e 7), *Ma*CM (8 e 9), *Ai*EtOH (12 e 13), *Ai*MeOH (14 e 15), *Ai*CM (16 e 17).



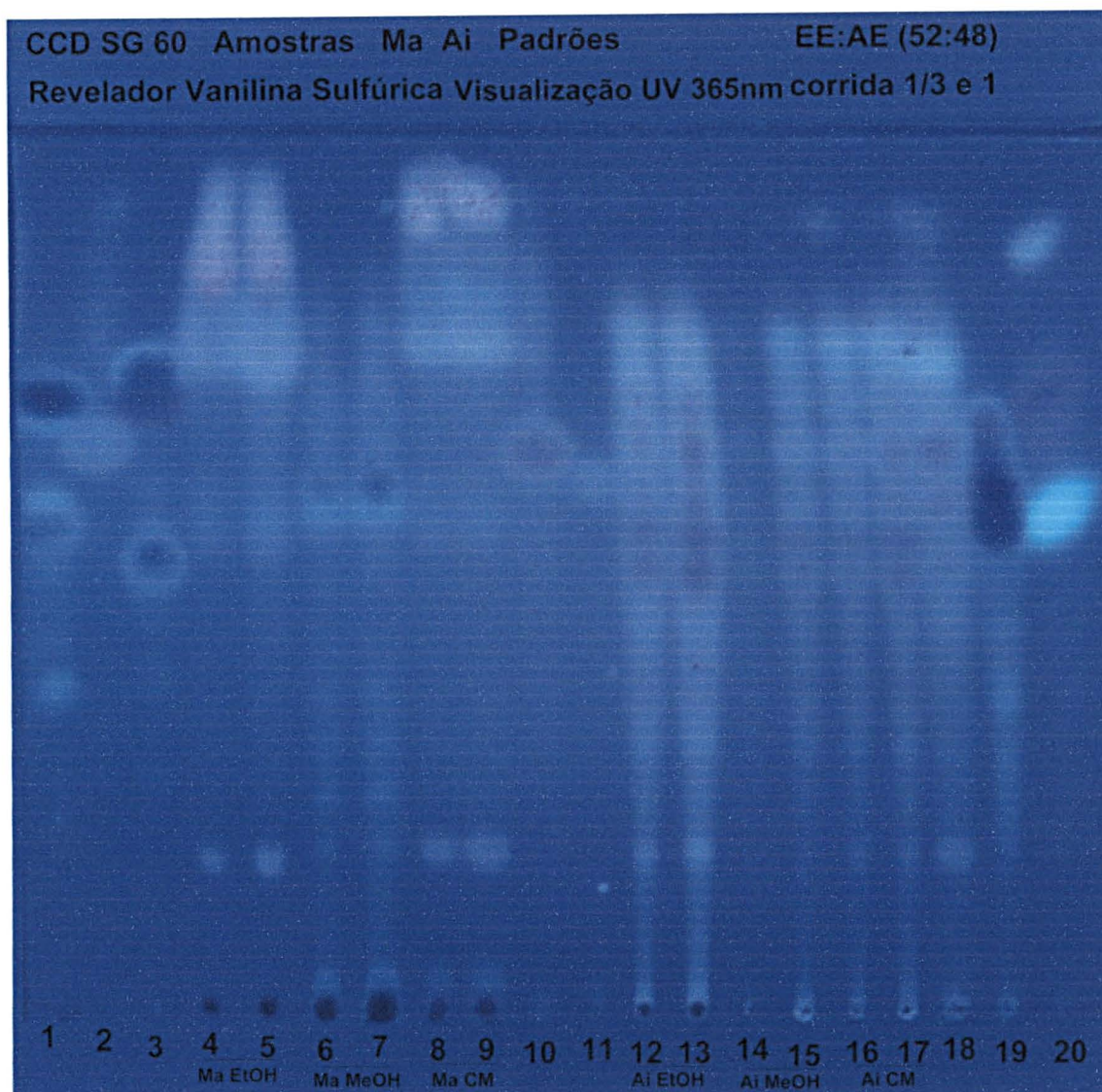


FIGURA 5.2: Cromatografia em camada delgada, visualização – UV 365nm

NOTAS: Padrões: 1-azedarachol (rósea) e 1428- RT 919 (avermelhada), 2- 1428- RT 906, 3- acetil azedarachin, 3- deactil salanin, 10- meliacarpinina, 11- azadirachtina, 18- azadirachtina semi purificada (AZA 16), 19- amoorastin, 20- azedarachin A, melianin B (amarelo) e trioleína (superior). Amostras: *Ma*EtOH (4 e 5), *Ma*MeOH (6 e 7), *Ma*CM (8 e 9), *Ai*EtOH (12 e 13), *Ai*MeOH (14 e 15), *Ai*CM (16 e 17).

Com a visualização UV em 365nm observa-se a presença de melianin B nos extratos de *M. azedarach*. Observa-se também a presença de outros compostos não identificados que

podem estar contribuindo para a atividade biológica presente nos extratos de frutos de Cinamomo.

O grande diferencial encontrado na comparação destes resultados cromatográficos é a ocorrência de uma população fortemente cromogênica (pouco abaixo do front de solvente) nos extratos mais apolares de cinamomo (4 e 5; 8 e 9; duplicados). Embora se situem na zona de migração da trioleína, não foi possível avançar com a identificação dos mesmos no sentido de caracterizá-los como triacilgliceróis.

## 5.2 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos diferentes extratos de Meliáceas

Os cromatogramas isocráticos abaixo de injeções normalizadas na mesma diluição das soluções mães (200mg/mL), representados refletem a complexidade dos compostos presentes nos diversos extratos das duas Meliáceas. Nos cromatogramas de *A. indica* foi possível uma melhor separação dos compostos possivelmente incluindo os triterpenóides como observado nas cromatografias de camada delgada (FIGURA 5.1 e 5.2). Os cromatogramas de extrato metanólico e clorofórmio: metanol de *M. azedarach*CM (FIGURAS 5.4 e 5.5) apresentaram uma separação melhor do que o extrato etanólico para a fase móvel testada (acetonitrila: água – 50:50) (FIGURA 5.5). Para a *Azadirachta indica* no extrato metanólico (FIGURA 5.7) não houve uma separação tão nítida como no extrato etanólico (FIGURA 5.6) e no clorofórmio: metanol com a mesma fase móvel (FIGURA 5.8).

Provavelmente, a promovida riqueza dos componentes com triterpenos entre 2 ½ e 3 ½ minutos do extrato metanólico de cinamomo (FIGURA 5.4) possa se correlacionar com a menor CL<sub>50</sub> dentre todos obtidos, ou seja, 0,0044g/%, ou seja, menos que 5mg/mL do volume total do ensaio ou meio aquoso (150mL).



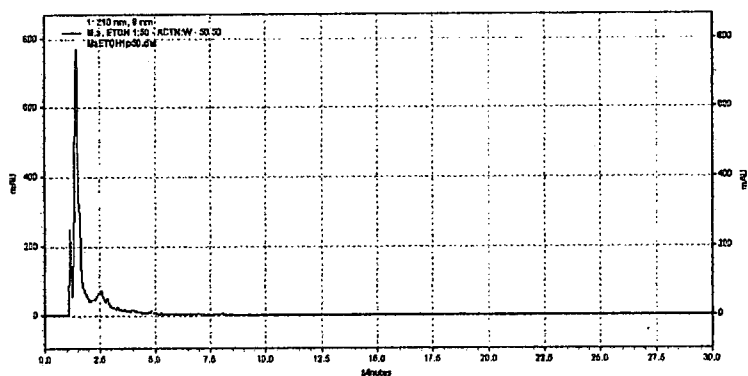


FIGURA 5.3: Cromatograma de extrato etanólico de *M. azedarach* 1:50

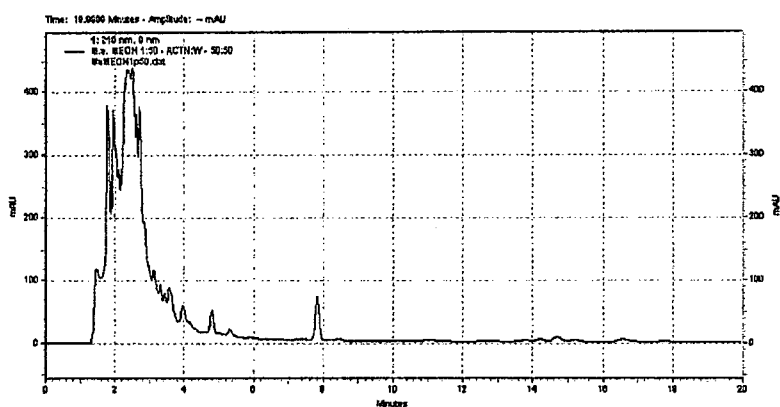


FIGURA 5.4: Cromatograma de extrato metanólico de *M. azedarach* 1:50

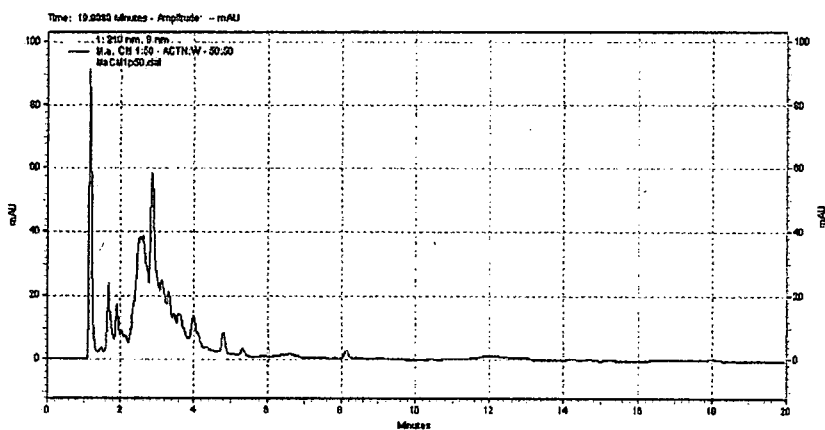


FIGURA 5.5: Cromatograma de extrato clorofórmio: metanol de *M. azedarach* 1:50

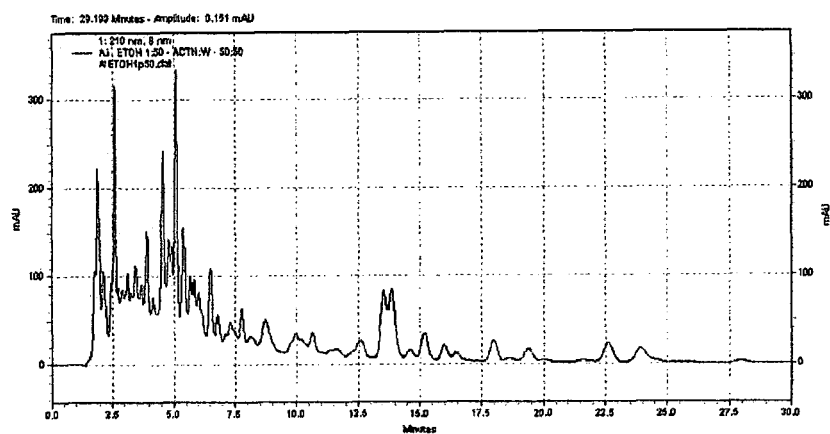


FIGURA 5.6: Cromatograma de extrato etanólico de *A. indica* 1:50

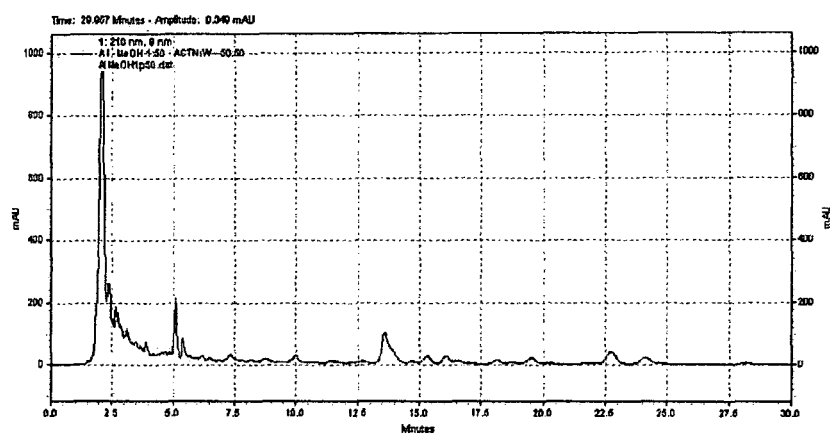


FIGURA 5.7: Cromatograma de extrato metanólico de *A. indica* 1:50

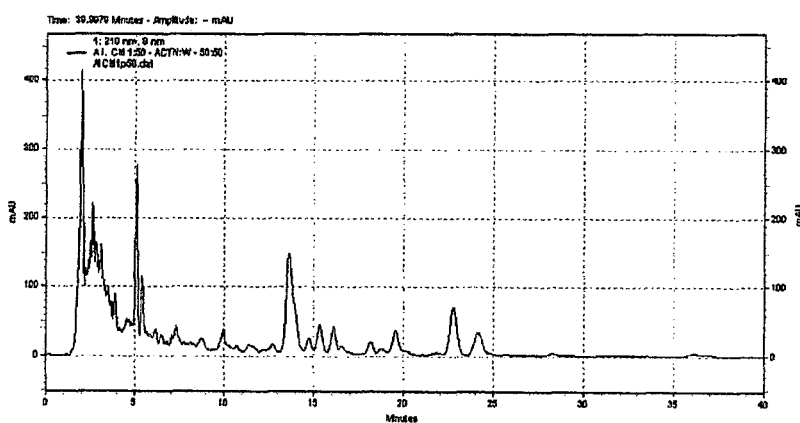


FIGURA 5.8: Cromatograma de extrato clorofórmio: metanol de *A. indica* 1:50

### 5.3 Resultados do ensaio preliminar de bioatividade/ citotoxicidade

Os extratos etanólicos, metanólicos e de clorofórmio: metanol totais de *A. indica* (nim) e *M. azedarach* (cinamomo) foram testados frente náuplios de *Artemia salina* recém eclodidos em salina artificial e observados em intervalos de 6 em 6 horas por um período de 24 horas. Para esses extratos se encontraram concentrações letais aproximadas indicadas como CL<sub>50</sub> na tabela (5.1) a seguir.

Os valores encontrados para CL<sub>50</sub> variaram entre 80 e 800µg/mL, demonstrando letalidade significativa contra os náuplios. Os extratos que resultam em CL<sub>50</sub> < 500µg/mL foram então considerados bons candidatos a apresentar atividade larvícida (MEYER et. al., 1982), portanto, como potencial atividade a ser em seguida ensaiada contra larvas de *A. aegypti*.

TABELA 5.1: Concentração letal 50% dos diversos extratos totais em µg/mL

Teste com <i>A. salina</i>	CL <sub>50</sub>
<i>M. azedarach</i> EtOH	200µg/mL
<i>M. azedarach</i> C:M	200µg/mL
<i>M. azedarach</i> MeOH	80µg/mL
<i>A. indica</i> EtOH	200µg/mL
<i>A. indica</i> C:M	800µg/mL
<i>A. indica</i> MeOH	400µg/mL

### 5.4 Resultados de bioatividade testado contra larvas de *Aedes aegypti*

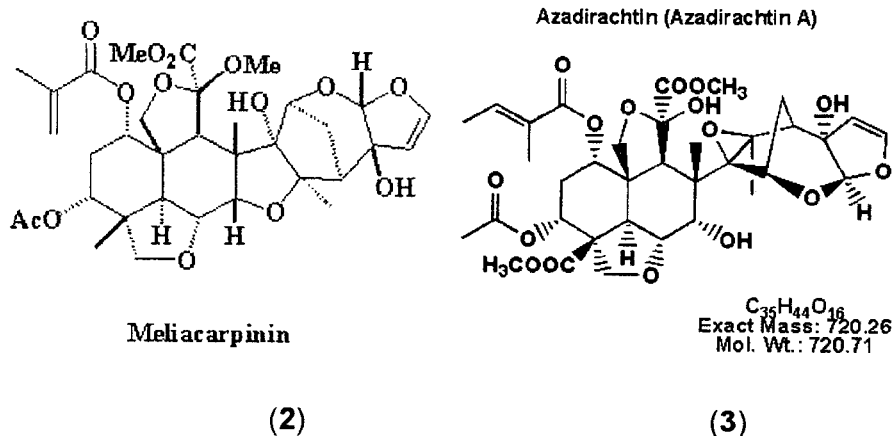
Encontra-se na literatura que a azadirachtina é um inibidor de crescimento de mosquitos, sendo o principal composto que demonstrou atividade inseticida contra várias espécies, dentre os numerosos compostos naturais de Meliáceas. Ademais, foram relatados outros componentes presentes em *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* que apresentam

atividade inseticida atuando como inibidores no processo de ecdise (atuando no sistema hormonal, especialmente no nível de síntese química da ecdisona), inibidores de alimentação, ação repelente e em outros parâmetros neuroendócrinos (SIDDIQUI et. al., 1986; SCHMUTTERER, 1990; CHAMPAGNE et.al., 1992; DUA, NAGPAL e SHARMA, 1995; HUANG et. al., 1995; MITCHELL et. al., 1997; KARNAVAR e DLAMINI, 1998; BOHNENSTENGEL et. al., 1999; SIDDIQUI et.al., 2000).

Os resultados corroboram com outras pesquisas, uma vez que SOUZA e VENDRAMIM (2000 e 2001) observaram efeito ovicida de extratos de folhas de *M. azedarach* quando aplicados sobre ovos de *Bemisia tabaci*. Além da atividade ovicida também se detectou propriedade repelente (HAMMAD et.al., 2000a).

Os extratos etanólicos de frutos de *M. azedarach* apresentaram ação repelente para ninfas de *Triatoma infestans*, sendo os extratos de frutos verdes os mais eficazes (VALLADARES et. al., 1999).

Cabe lembrar que os limonóides dominantes em *M. azedarach*, como meliacarpina (2), tem estrutura assemelhadas, mas não idêntica a azadirachtina (3) de *A. indica*, conforme mostrado a baixo.



Em prévias investigações com *M. azedarach* a mortalidade causada em larvas de *Spodoptera littoralis* foi, principalmente, pela interrupção da muda e por defeitos morfogénéticos. A ocorrência de estádios intermediários larva-pupa foi descoberta após tratamento com extratos de *M. azedarach*, e sugeriu interferência na regulação do hormônio Juvenil de insetos. A ecdisona desencadeia a muda, mas, ainda assim, depende do hormônio Juvenil que controla os graus de direção e diferenciação para cada muda (SCHMIDT et. Al, 1998). É o que se ilustra na figura 5.9.

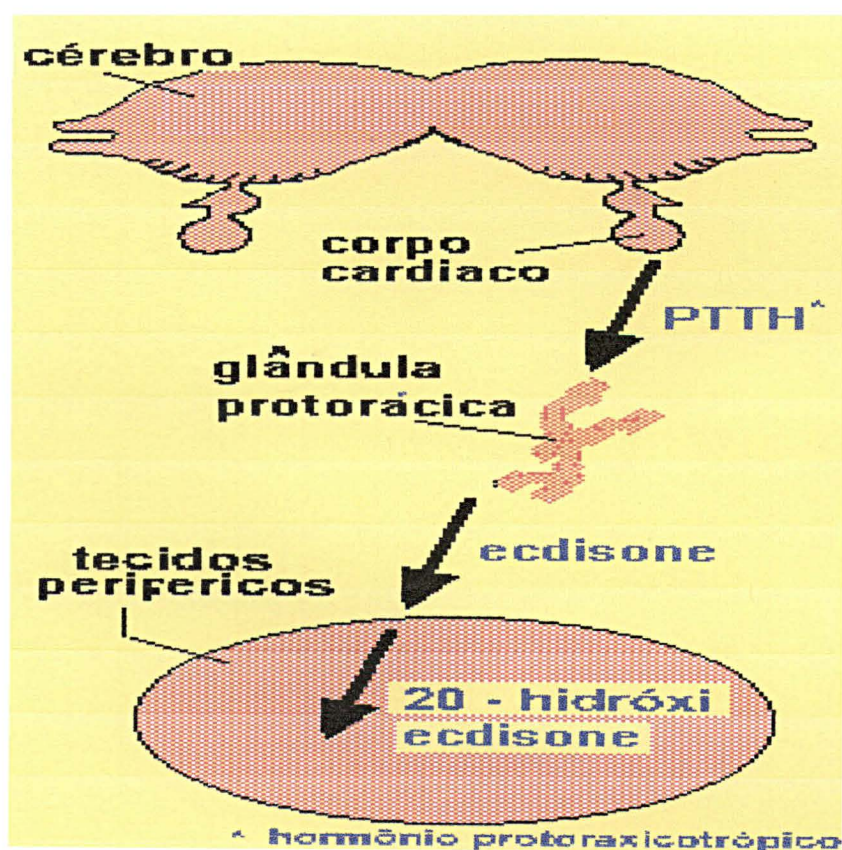


FIGURA 5.9: Síntese do hormônio juvenil acoplado a Ecdisona

O nível de suscetibilidade ( $CL_{50}$  e  $CL_{95}$ ) das larvas de *Aedes aegypti* em presença de extratos etanólicos de caroços de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica* foi: sem alimento a 25°C para *M. azedarach*  $CL_{50}$  0,166g/% e  $CL_{95}$  0,60g/% e a 30°C os seguintes  $CL_{50}$  0,152g/%,



CL<sub>95</sub> 0,537g/%. Para *A. indica* no ensaio sem alimento a 25°C apresentou a CL<sub>50</sub> 0,044g/%, CL<sub>95</sub> 0,124g/% e a 30°C CL<sub>50</sub> 0,063g/%, CL<sub>95</sub> 0,21g/% (TABELA 5.3 e GRÁFICOS 5.1).

Os bioensaios realizados a 25°C e a 30°C sem alimento as CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> da *A. indica* estão dentro do intervalo de confiança da *M. azedarach* (TABELA 5.3). O bioensaio pode ser visualizado na FIGURA 5.10. (WANDSCHEER et. al, 2003).

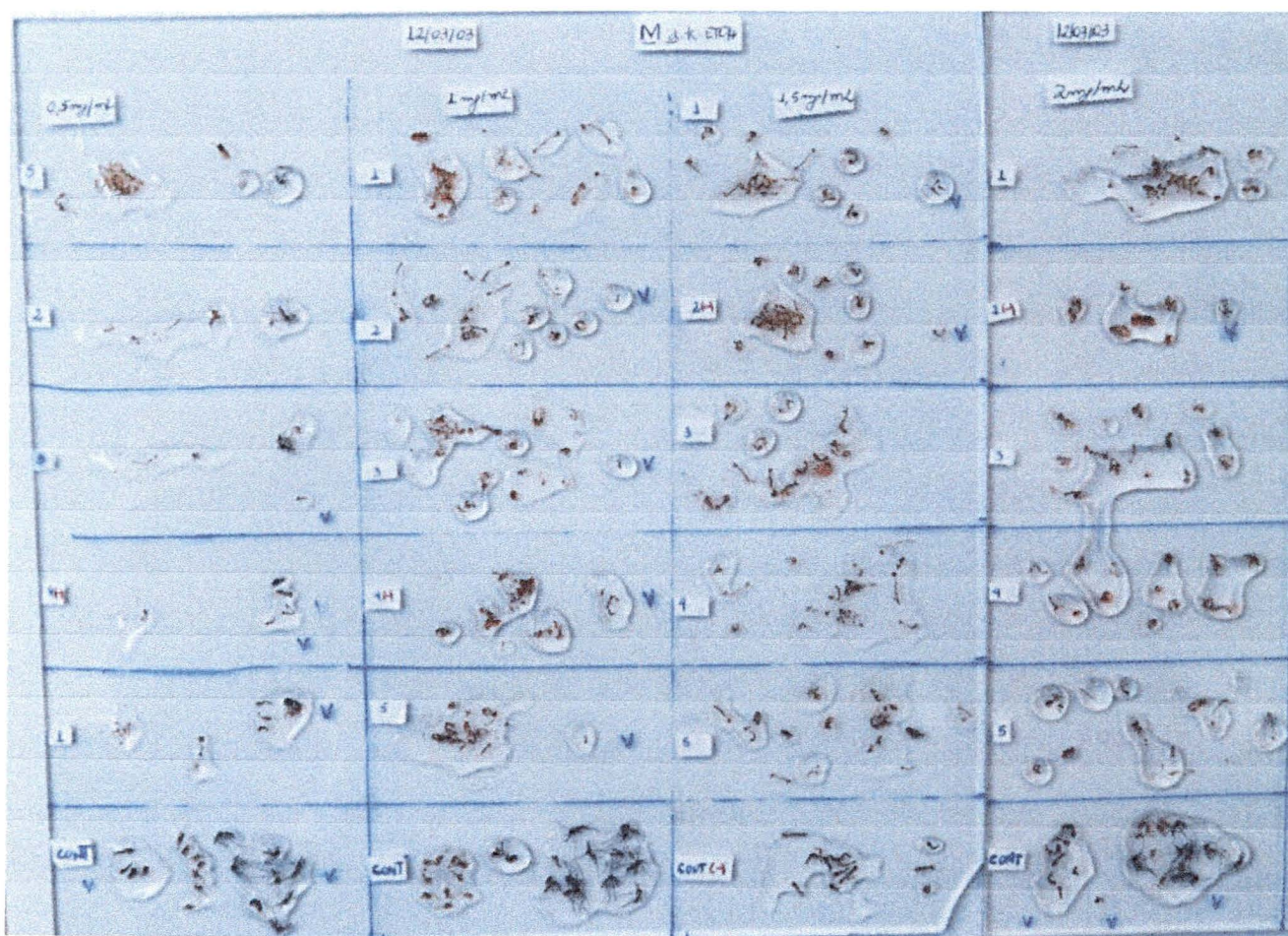


FIGURA 5.10: Bioensaio realizado com extrato etanólico de *M. azedarach* a 25°C sem alimento.

NOTAS: As colunas são representadas por diferentes concentrações de extratos etanólico, e a última linha é representada pelos controles de cada concentrações nas quais se observa o desenvolvimentos de adultos.

Em qualquer uma das duas temperaturas testadas, o extrato etanólico bruto de nim é no mínimo 2,4x mais eficiente do que o equivalente de cinamomo tanto para CL<sub>50</sub> quanto para CL<sub>95</sub> e isto na temperatura mais baixa (25°C). Tal maior a eficácia relativa se intensifica para um máximo de 5,2x no caso da CL<sub>95</sub> medida na temperatura mais alta (30°C). Isto poderia se explicado por duas razões independentes: a anatomia da própria semente de cada tipo de fruto assim se os bioativos (e.g. limonóides) estiverem concentrados na parte mole (germe), nim estaria favorecido, pois a contribuição do endocarpo do caroço é gravimetricamente, muito menor. Porém se a parte dura (caroço/ endocarpo) de Cinamomo apresenta contribuição na extração dos princípios ativos, mas essa extração é mais difícil de ocorrer, havendo uma menor concentração comparada com o nim. E a segunda razão seria a estabilidade do conjunto bioativo frente à temperatura e tempo como parâmetros negativamente modificados.

Das quatro condições testadas (diferentes temperaturas; larvas sem e com alimentação), os resultados, incidentalmente isonômicos, mais favoráveis: pró-cinamomo estão na metade superior da TABELA 5.3. A temperatura do meio natural, de 25°C é mais realista e geograficamente mais compatível com a maior parte do território brasileiro, se comparado a 30°C. Para representar uma situação mais realista para fins epidemiológicos, foi disponibilizada alimentação para as larvas, com o objetivo de que o experimento não se inviabilizasse *per se*.

Satisfeitas estas duas situações o extrato de cinamomo e, tanto para CL<sub>50</sub> quanto para CL<sub>95</sub>, 1,6x mais efetiva que o nim.

GRÁFICO 5.1: Concentrações letais de extratos etanólicos de *M. azedarach* e *A. indica* em bioensaios sem alimentação.

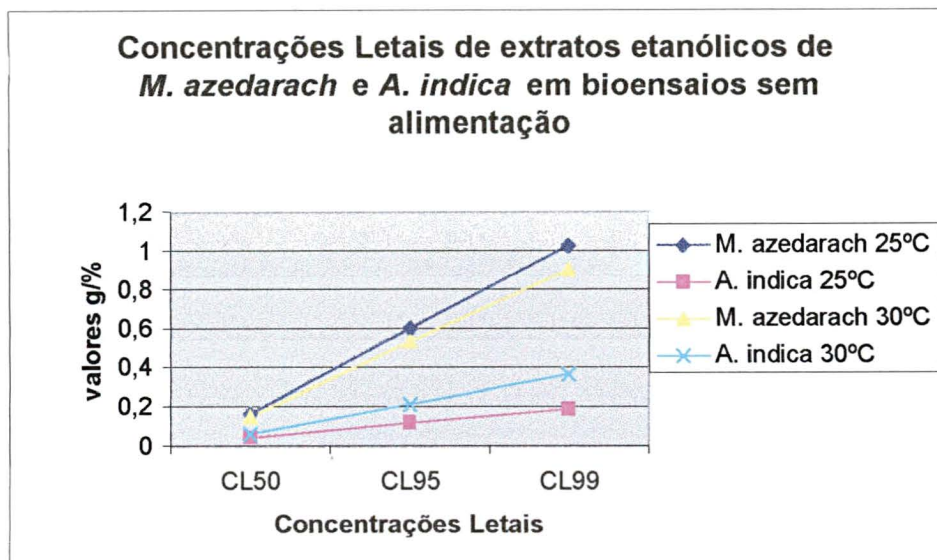


TABELA 5.2: Representação em porcentagem das partes dos caroços de nim e cinamomo

	Caroço	Sementes e tegumento	Caroço + semente e tegumento
nim	51,6%	48,4%	100%
cinamomo	69,9%	30,1%	100%



TABELA 5.3: Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de *M. azedarach* e de *A. indica* em extratos etanólicos para larvas de *A. aegypti* (Colônia Rockefeller) sem alimento; Temperatura;  $\chi^2$ ; Colônia Rockefeller; Intervalo de Confiança (IC).

	CL <sub>50</sub> g/%	IC	CL <sub>95</sub> g/%	IC	$\chi^2$
<i>M. azedarach</i> 25°C	0,166039	0,093434- 1,826912	0,603645	0,210280- 59,004703	0,931292
<i>A. indica</i> 25°C	0,044217	0,039222- 0,051084	0,124336	0,098164- 0,172713	1,850673
<i>M. azedarach</i> 30°C	0,151613	0,091683- 0,758418	0,537290	0,212193- 12,061445	2,750521
<i>A. indica</i> 30°C	0,063120	0,042116- 0,159298	0,217767	0,104577- 1,826137	9,907542

NOTAS: Solubilizados em etanol anidro

Os controles apresentaram 0% de mortalidade.

Nos bioensaios com alimento obtêm-se os resultados seguintes para: *M. azedarach* a 25°C a CL<sub>50</sub> 0,035g/%, CL<sub>95</sub> 0,175g/% , nos ensaios a 30°C a CL<sub>50</sub> 0,038g/%, CL<sub>95</sub> 0,119g/%. Para a *A. indica* a 25°C CL<sub>50</sub> 0,056g/%, CL<sub>95</sub> 0,277g/% e nos bioensaios realizados a 30°C a CL<sub>50</sub> 0,017g/%, CL<sub>95</sub> 0,073g/% (TABELA 5.4).

Nos ensaios em que as larvas foram alimentadas à temperatura de 25°C os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> de *M. azedarach* estão inseridos no intervalo de confiança de *A. indica*. A temperatura de 30°C as CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> da *A. indica* estão dentro do intervalo de confiança de *M. azedarach* (TABELA 5.4 e GRÁFICO 5.2).

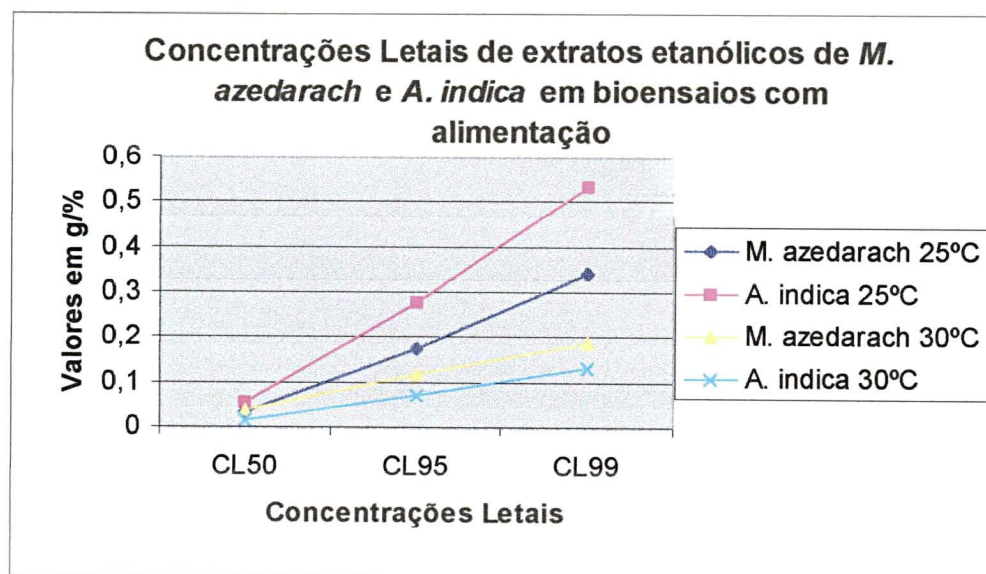
TABELA 5.4: Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de *M. azedarach* e de *A. indica* em extratos etanólicos para larvas de *A. aegypti* (Colônia Rockefeller) com alimento; Temperatura;  $\chi^2$ ; Colônia Rockefeller; Intervalo de Confiança (IC).

	CL <sub>50</sub>	IC	CL <sub>95</sub>	IC	$\chi^2$
	g/%		g/%		
<i>M. azedarach</i> 25°C	0,034496	0,029699- 0,041421	0,175810	0,122926- 0,295438	2,091790
<i>A. indica</i> 25°C	0,056105	0,029878- 0,268046	0,276994	0,096545- 8,992303	21,607275
<i>M. azedarach</i> 30°C	0,038469	0,024113- 0,210480	0,118985	0,055324- 22,780197	26,410502
<i>A. indica</i> 30°C	0,017175	0,011536- 0,026723	0,073109	0,040741- 0,342891	14,311704

NOTAS: Solubilizado em etanol anidro

Somente o ensaio a 30°C de *A. indica* apresentou 1% de mortalidade.

GRÁFICO 5.2: Concentrações letais de extratos etanólicos de *M. azedarach* e *A. indica* em bioensaios com alimentação



As concentrações diagnóstico ( $CL_{99}$ ) de *Melia azedarach* nos bioensaios sem alimento foram: a 25°C  $CL_{99}$  1,030g/% e a 30°C  $CL_{99}$  0,907g/%, e com alimento: a 25°C  $CL_{99}$  0,345g/% e a 30°C  $CL_{99}$  0,189g/%. Os bioensaios sem alimento para *A. indica* apresentaram: a 25°C  $CL_{99}$  0,190g/% e a 30°C  $CL_{99}$  0,363g/%, e nos bioensaios com alimento a 25°C  $CL_{99}$  0,536g/% e 30°C  $CL_{99}$  0,133g/% (TABELA 5.5, GRÁFICOS 5.1 e 5.2).

A bioatividade frente às larvas de *A.aegypti* é claramente dependente tanto da temperatura ambiente quanto da disponibilidade ou não de alimento.

TABELA 5.5: Concentração diagnóstico ( $CL_{99}$ ) dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de *M. azedarach* e de *A. indica* para larvas de *A. aegypti* (Colônia Rockefeller) sem e com alimento, Temperaturas 25°C e 30°C quando em presença de extratos *MeEtOH* e *AiEtOH*

	$CL_{99}$ g/% sem alimento	$CL_{99}$ g/% com alimento
<i>M. azedarach</i> 25°C	1,030026	0,345020
<i>A. indica</i> 25°C	0,190757	0,536483
<i>M. azedarach</i> 30°C	0,907151	0,189891
<i>A. indica</i> 30°C	0,363615	0,133167



Ao se intensificar a busca pelo efeito máximo para os bioativos das Meliáceas, se atingiu o máximo de letalidade mensurável com confiabilidade estatística (CL<sub>99</sub>; morte de 99 exemplares dentre a centena populacional). E, ainda, explorando os dois graus de temperaturas claramente definidas e a provisão ou não de alimento as larvas, as observações e conclusões anteriores se confirmam (TABELA 5.5).

Nas condições mais realistas (25°C e larvas alimentadas) o extrato etanólico de caroços integrais de frutos despulpados de Cinamomo revela-se novamente 1,6x mais eficiente do que o equivalente oriundo de nim.

Para a temperatura mais elevada (30°C), independentemente da provisão ou não de alimento, contrariamente o nim é mais eficiente.

Nos biensaio realizados com extrações dos caroços com mistura de solventes: clorofórmio:metanol apresentaram os seguintes resultados: a 25°C sem alimento para *M. azedarach* CL<sub>50</sub> 0,059g/%, CL<sub>95</sub> 0,161g/% e a 30°C CL<sub>50</sub> 0,302g/%, CL<sub>95</sub> 2,213g/%. A *A. indica* apresentou as seguintes: a 25°C também sem alimento CL<sub>50</sub> 0,453g/%, CL<sub>95</sub> 10,551g/% e a 30°C CL<sub>50</sub> 0,054g/% CL<sub>95</sub> 0,126g/% (TABELA 5.6 e GRÁFICO 5.3 e 5.4).

GRÁFICO 5.3: Concentrações letais de extratos clorofórmio:metanol de *M. azedarach* e *A. indica* em bioensaio sem alimentação.

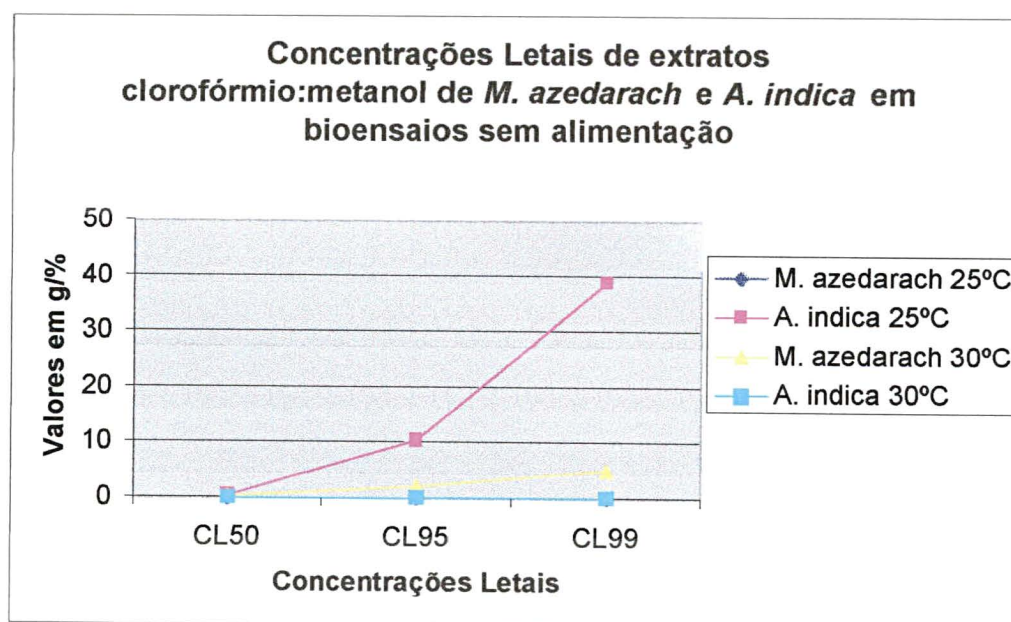


GRÁFICO 5.4: Concentrações letais de extratos clorofórmio:metanol de *M. azedarach* a 25°C e *A. indica* a 30°C nos bioensaios sem alimentação.

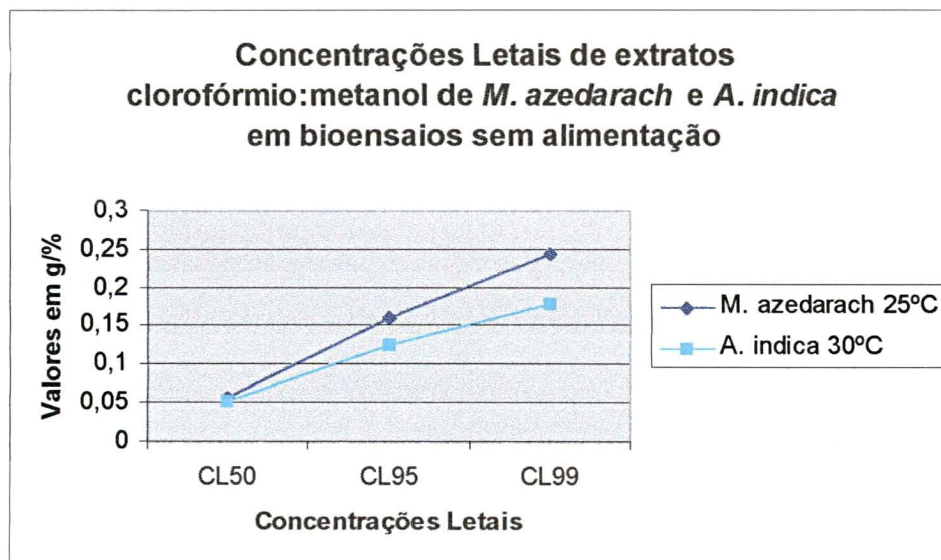


TABELA 5.6: Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de *M. azedarach* e de *A. indica* extratos clorofórmio:metanol para larvas de *A. aegypti* (Colônia Rockefeller) sem alimento; Temperatura;  $\chi^2$ ; Colônia Rockefeller; Intervalo de Confiança (IC).

	CL <sub>50</sub>	IC	CL <sub>95</sub>	IC	$\chi^2$
	g/%		g/%		
<i>M. azedarach</i> 25°C	0,059038	0,050672- 0,073072	0,161496	0,118328- 0,262720	6,321004
<i>A. indica</i> 25°C	0,452806	0,155313- 14,355405	10,550797	1,231732- 12831,810792	1,1164260
<i>M. azedarach</i> 30°C	0,302643	0,137558- 2,775817	2,212896	0,535119- 137,910554	1,869342
<i>A. indica</i> 30°C	0,054335	0,048159- 0,065801	0,126751	0,094314- 0,222697	4,748014

NOTAS: Retomados, para fins de ensaio, em etanol anidro, mesmo solvente dos controles.

Somente o ensaio a 25°C apresentou 1% de mortalidade os demais obtiveram 0%.

Os resultados obtidos dos bioensaios de extratos clorofórmio:metanol alimentando as larvas foram diferentes. Para os extratos de *M. azedarach* a 25°C CL<sub>50</sub> 0,035g/%, CL<sub>95</sub> 0,077g/% e a 30°C CL<sub>50</sub> 0,028g/% e CL<sub>95</sub> 0,138g/%. E para os bioensaios realizados com alimento para *A. indica* resultaram a 25°C as seguintes CL<sub>50</sub> 1,475g/%, CL<sub>95</sub> 133,288g/% e a 30°C CL<sub>50</sub> 0,026g/%, CL<sub>95</sub> 0,263g/% (TABELA 5.7, GRÁFICOS 5.5 e 5.6).

TABELA 5.7: Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de *M. azedarach* e de *A. indica* extratos clorofórmio:metanol para larvas de *A. aegypti* (Colônia Rockefeller) com alimento; Temperatura; X<sup>2</sup>; Colônia Rockefeller; Intervalo de Confiança (IC).

	CL <sub>50</sub> g/%	IC	CL <sub>95</sub> g/%	IC	$\chi^2$
<i>M. azedarach</i> 25°C	0,035049	0,023384- 0,054937	0,076886	0,051127- 1,010179	15,177425
<i>A. indica</i> 25°C	1,475191	0,290177- 488,464639	133,288490	5,251837- 17209492,903	0,502043
<i>M. azedarach</i> C:M 30°C	0,028442	0,024742- 0,033524	0,138741	0,100717- 0,216958	5,236429
<i>A. indica</i> C:M 30°C	0,026151	0,014769- 0,093879	0,263691	0,080665- 122,660785	15,861446

NOTAS: Os ensaios de ambas as espécies a 30°C apresentaram 1% de mortalidade, os ensaios sem alimentação não apresentaram mortalidade.



GRÁFICO 5.5: Concentrações letais de extrato clorofórmio:metanol de *M. azedarach* e *A. indica* em bioensaios com alimentação.

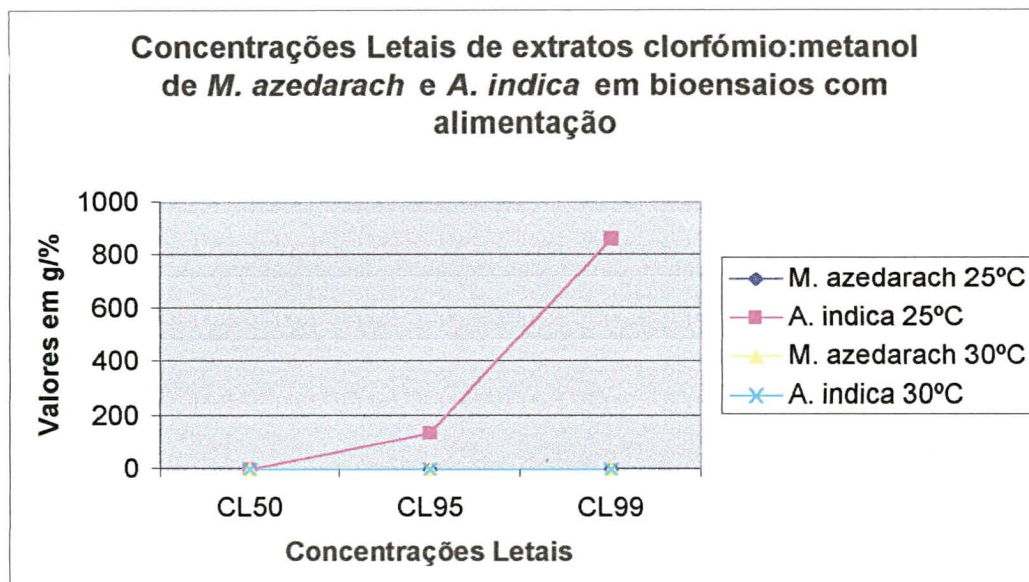
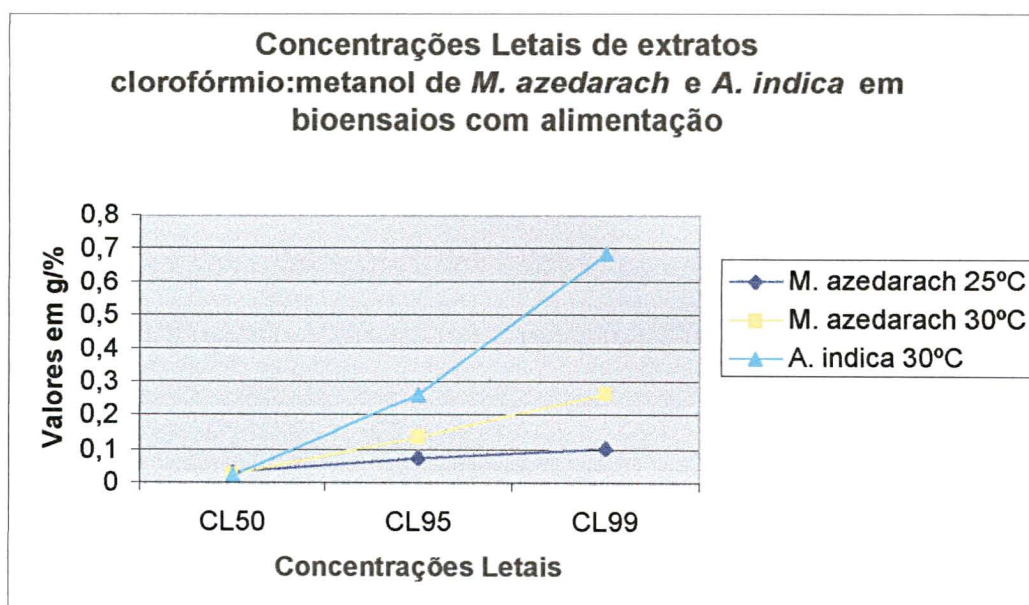


GRÁFICO 5.6: Concentrações letais de extratos clorofórmio:metanol dos menores valores encontrados de *M. azedarach* e *A. indica* em bioensaios com alimentação.



Concentração diagnóstico ( $CL_{99}$ ) de *Melia azedarach* nos bioensaios com extratos clorofórmio:metanol sem alimento foram: a 25°C  $CL_{99}$  0,245g/% e a 30°C  $CL_{99}$  5,042g/%, e com alimento: a 25°C  $CL_{99}$  0,106g/% e a 30°C  $CL_{99}$  0,267g/%. Os bioensaios, sem alimento, para *A. indica* apresentaram: a 25°C  $CL_{99}$  38,846g/% e a 30°C  $CL_{99}$  0,179g/%, e nos bioensaios com alimento a 25°C  $CL_{99}$  860,041g/% e 30°C  $CL_{99}$  0,686g/% (TABELA 5.8, GRÁFICOS 5.5 e 5.6).

TABELA 5.8: Concentração diagnóstico ( $CL_{99}$ ), Temperaturas 25°C e 30°C dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de *M. azedarach* e de *A. indica* extratos clorofórmio:metanol para larvas de *A. aegypti* (Colônia Rockefeller) sem e com alimento.

	$CL_{99}$ g/% sem alimento	$CL_{99}$ g/% com alimento
<i>M. azedarach</i> 25°C	0,244954	0,106436
<i>A. indica</i> 25°C	38,846663	860,041119
<i>M. azedarach</i> 30°C	5,042595	0,267377
<i>A. indica</i> 30°C	0,179989	0,686391

Os resultados dos mesmos ensaios padrão de larvas, mas agora com extratos muito mais apolares consequência do uso da mistura clorofórmio:metanol (polaridade 0,675), um solvente muito mais eficiente para matéria graxa do que o é o etanol (polaridade 0,88) puro à frio. Estes não apenas confirmam as conclusões anteriores da bioatividade à luz da influência da temperatura (25°C) mais favorável no cinamomo, mas sobre tudo quanto ao efeito da provisão de alimento, situação em que o cinamomo, em todos os ensaios, passa a ser muito mais eficiente que o nim.



Curiosamente, de todas as dosagens até aqui ensaiadas, as mais eficientes proporcionalmente encontradas foram aquelas para CL<sub>50</sub> a 25°C na condição de alimentação das larvas para extratos etanólicos e a de clorofórmio:metanólico: 34 e 35mg/mL respectivamente. No entanto, os ensaios a 30°C, com provisão de alimento, de cinamomo foram superados pelos extratos clorofórmio: metanólico de nim com CL<sub>50</sub> 28 e 26mg/mL respectivamente.

A impressionante superioridade do Cinamomo em relação ao nim representada na TABELA 5.8 foi, contudo, mais dramaticamente constata no resultado de CL<sub>99</sub>, independentemente ou não da presença de alimento para larvas.

Os bioensaios realizados com as larvas de *Aedes aegypti* em presença de extratos metanólicos de caroços de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica* resultaram em: sem alimento a 25°C para *M. azedarach* CL<sub>50</sub> 0,014g/% e CL<sub>95</sub> 0,080g/% e a 30°C os seguintes CL<sub>50</sub> 0,062g/%, CL<sub>95</sub> 0,325g/%. Para *A. indica* no ensaio sem alimento a 25°C apresentou a CL<sub>50</sub> 0,368g/%, CL<sub>95</sub> 4,155g/% e a 30°C CL<sub>50</sub> 0,084g/%, CL<sub>95</sub> 0,325g/% (TABELA 5.9, GRÁFICOS 5.7 e 5.8).

GRÁFICO 5.7: Concentrações letais de extratos metanólicos de *M. azedarach* e *A. indica* em bioensaios sem alimentação.

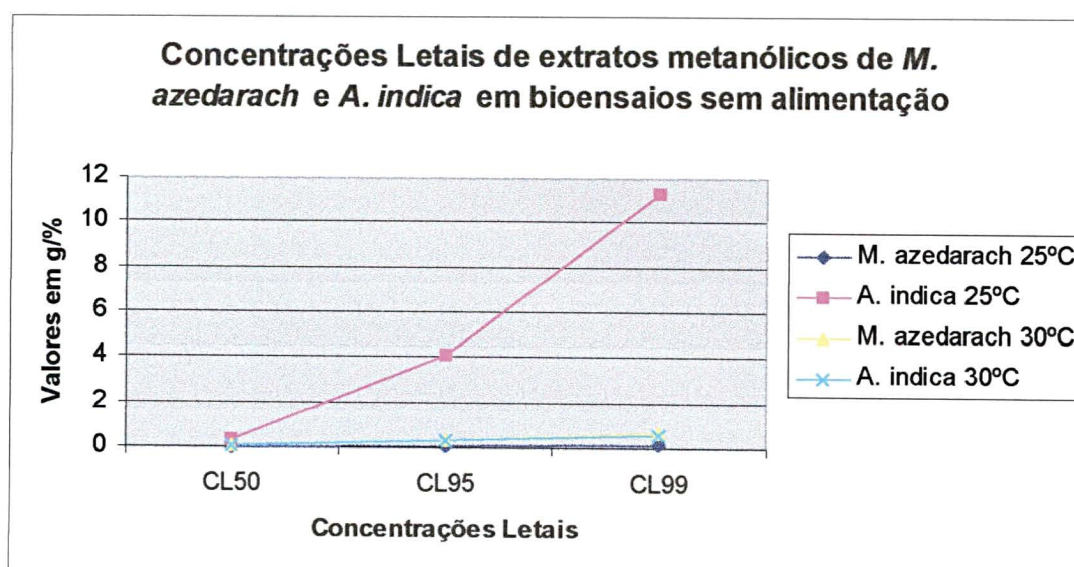


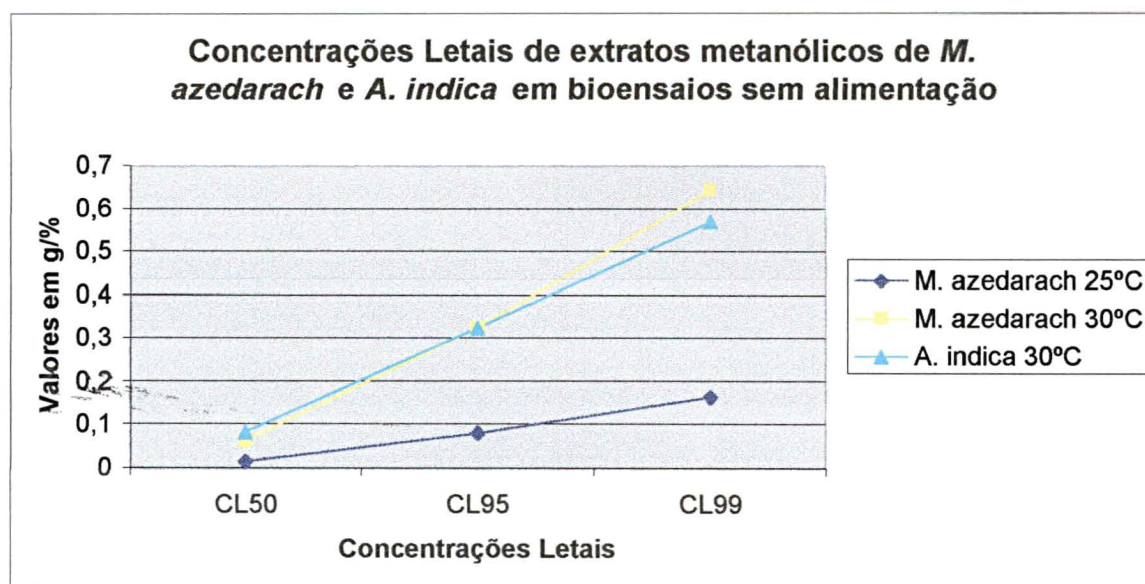
TABELA 5.9: Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de *M. azedarach* e de *A. indica* extratos metanólicos para larvas de *A. aegypti* (Colônia Rockefeller) sem alimento; Temperatura;  $\chi^2$ ; Colônia Rockefeller; Intervalo de Confiança (IC).

	CL <sub>50</sub> g/%	IC	CL <sub>95</sub> g/%	IC	$\chi^2$
<i>M. azedarach</i> 25°C	0,014173	0,008938- 0,026703	0,080124	0,037417- 0,644337	17,523321
<i>A. indica</i> 25°C	0,367993	0,158691- 2,905818	4,155123	0,879690- 213,554695	1,483711
<i>M. azedarach</i> 30°C	0,062603	0,049896- 0,088400	0,325547	0,191832- 0,785543	-0,153577
<i>A. indica</i> 30°C	0,083926	0,065552- 0,123709	0,325349	0,196895- 0,760988	1,550349

NOTAS: Retomados em DMSO, mesmo solvente dos controles.

Em todos os ensaios a mortalidade foi de 0%.

GRÁFICO 5.8: Concentrações letais de extratos metanólicos dos menores valores encontrados para *M. azedarach* e *A. indica* em bioensaios sem alimentação.



Portanto, ao utilizar-se o mesmo solvente de extração e realizados os bioensaios com a alimentação das larvas obteve-se resultados distintos. Para *M. azedarach* 25°C CL<sub>50</sub> 0,021g/%, CL<sub>95</sub> 0,079g/% e a 30°C CL<sub>50</sub> 0,004g/% e CL<sub>95</sub> 0,022g/%. *A. indica* a 25°C resultou a CL<sub>50</sub> 0,518g/%, CL<sub>95</sub> 7,316g/% e a 30°C CL<sub>50</sub> 0,069g/%, CL<sub>95</sub> 0,612g/% (TABELA 5.10, GRÁFICOS 5.9 e 5.10).

TABELA 5.10: Concentração letal 50 e 95% dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de *M. azedarach* e de *A. indica* extratos metanólicos para larvas de *A. aegypti* (Colônia Rockefeller) com alimento; Temperatura; X<sup>2</sup>; Colônia Rockefeller; Intervalo de Confiança (IC).

	CL <sub>50</sub> g/%	IC	CL <sub>95</sub> g/%	IC	χ <sup>2</sup>
<i>M. azedarach</i> 25°C	0,021215	0,014064- 0,031042	0,079104	0,047484- 0,305174	14,119989
<i>A. indica</i> 25°C	0,518480	0,197888- 5,303613	7,315926	1,296699- 543,497108	3,554951
<i>M. azedarach</i> 30°C	0,004386	0,003592- 0,005121	0,022632	0,017644- 0,032679	3,734798
<i>A. indica</i> 30°C	0,069851	0,052310- 0,107995	0,612075	0,311173- 1,836736	0,190634

NOTA: A mortalidade encontrada também neste caso foi de 0%.

Concentração diagnóstico (CL<sub>99</sub>) de *Melia azedarach* para os bioensaios citados acima foram: sem alimento a 25°C CL<sub>99</sub> 0,164g/% e a 30°C CL<sub>99</sub> 0,644g/%, e com alimento: a 25°C CL<sub>99</sub> 0,136g/% e a 30°C CL<sub>99</sub> 0,044g/%. Os bioensaios realizados com extratos metanólicos de *A. indica* apresentaram sem alimentação: a 25°C CL<sub>99</sub> 11,334g/% e a 30°C CL<sub>99</sub> 0,570g/%, e nos bioensaios com alimento a 25°C CL<sub>99</sub> 21,885g/% e 30°C CL<sub>99</sub> 1,503g/% (TABELA 5.11, GRÁFICOS 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10)



GRÁFICO 5.9: Concentrações letais de extratos metanólicos de *M. azedarach* e *A. indica* em bioensaios com alimentação.

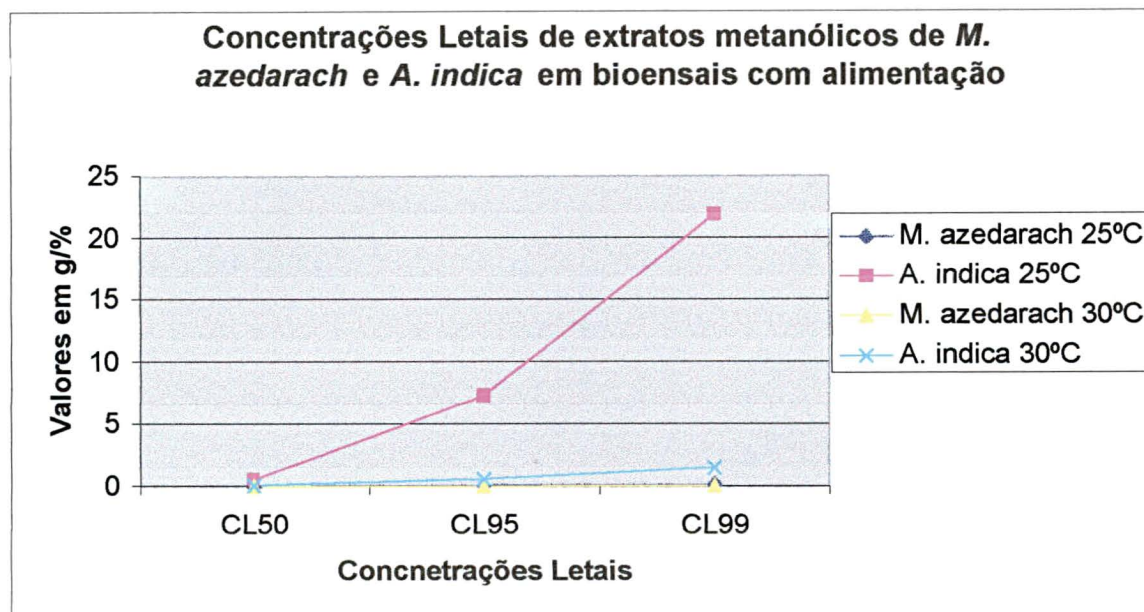


GRÁFICO 5.10: Concentrações letais de extratos metanólicos de *M. azedarach* e *A. indica* que apresentaram os menores resultados em bioensaios com alimentação.

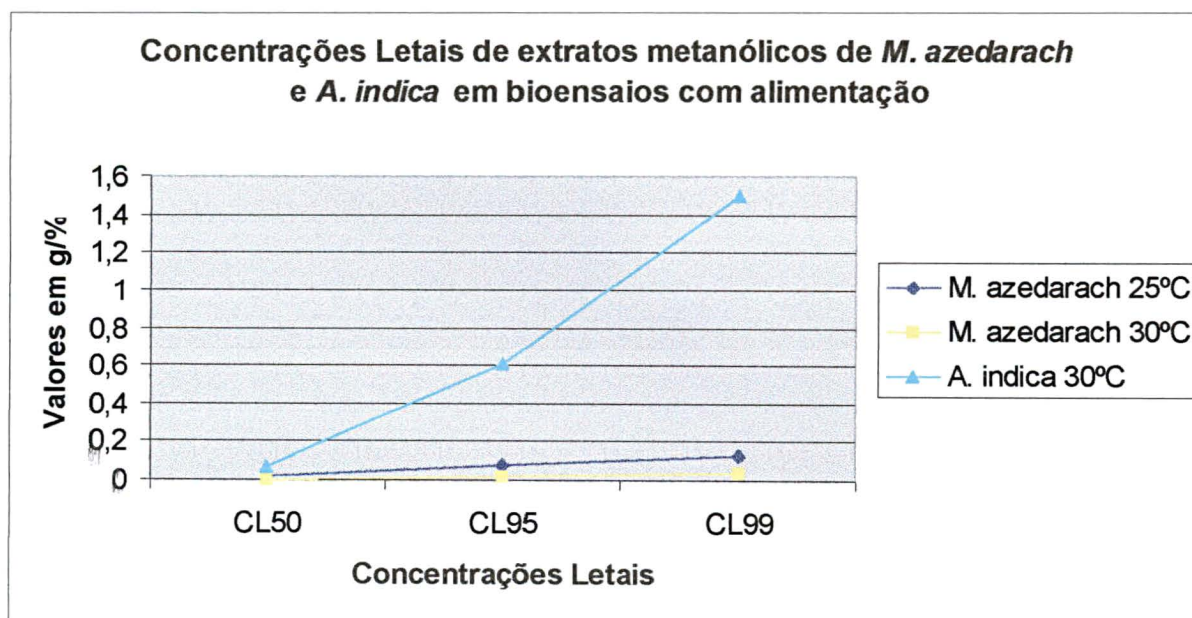


TABELA 5.11: Concentração diagnóstico (CL<sub>99</sub>) dos bioativos de sementes (caroços integral de frutos) de *M. azedarach* e de *A. indica* extratos metanólicos para larvas de *A. aegypti* (Colônia Rockefeller) sem e com alimento, Temperaturas 25°C e 30°C.

	CL <sub>99</sub>	CL <sub>99</sub>
	g/%	g/%
	sem	com
	alimento	alimento
<i>M. azedarach</i> 25°C	0,164134	0,136401
<i>A. indica</i> 25°C	11,334481	21,885549
<i>M. azedarach</i> 30°C	0,644219	0,044644
<i>A. indica</i> 30°C	0,570109	1,503269

Os resultados foram satisfatórios. No entanto, MONZON et al. (1994) demonstrou que extrato aquoso de folha de *A. indica* apresentou atividade larvicida contra *A. aegypti* o qual determinou a CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em 48 horas utilizando larvas de terceiro e quarto instar. Encontrou uma CL<sub>50</sub> = 0,3976 g/% e a CL<sub>90</sub> = 21,5592 g/%.

Neste trabalho as CL<sub>50</sub> variaram desde de 0,017175 a 1,475191 g/% para *A. indica* e de 0,004386 a 0,302643 g/% para *M. azedarach*. Portanto, estas plantas possuem atividade larvicida superior nos caroços dos frutos. Contrariando estes resultados há pesquisas que não comprovaram a atividade de extratos aquosos de folhas de *A. indica* em presença de larvas de *A. aegypti* em concentrações entre 0,0001 a 0,1 g/% (ZARROUG et al., 1988).

DZUL et al. (2000) utilizando macerado aquoso de folhas de *A. indica* descreveu mortalidade para larvas de 1º instar de 82,12% e para de 4º instar de 59,34%, em oposição aos resultados de ZARROUG et. al (1988).

Em estudo realizado, por ZEBITZ (1984), obteve-se vários tipos de extratos (aquoso de caroços de nim, extrato metanólico de caroço, e extração em aparelho de Soxhlet com os seguintes solventes: metanol, butanol, metil etil cetona e metil *terc* butil éter) sendo todos enriquecidos em azadirachtina. De modo que, o extrato aquoso enriquecido apresentou uma  $CL_{50} = 0,00782g/\%$  em 24 horas para larvas de 4º instar.

Quando se inverteu totalmente a polaridade do solvente extrator dos caroços integrais de frutos de Meliáceas comparativamente estudadas, uma vez mais de forma ainda mais cabal, pois independentemente da temperatura e também da provisão ou não de alimento às larvas, os extratos polares de cinamomo corroboraram a superioridade letal em relação aqueles de nim.

De fato, neste ensaio, e sem qualquer purificação dos bioativos nos extraídos de cinamomo (Tabela 5.9) se obteve 50 e 95% de mortalidade de larvas de *Aedes* com doses tão baixas quanto 22mg/mL ( $CL_{95}$  a 30°C) –21mg/mL ( $CL_{50}$  a 25°C) e mesmo apenas a  $CL_{50}$  a 30°C 4mg/mL.

Com isso, pode-se notar que deve haver diferenças na composição de folhas de *A. indica* dependendo da localização geográfica, sugerindo as diferenças encontradas pelos autores referentes as  $CL_{50}$ .

A variação no efeito de uma planta inseticida em função da parte botânica do vegetal utilizada para o preparo do extrato se deve ao fato de os componentes fitoinseticidas (triterpenóides, no caso das Meliaceas) não estarem distribuídos uniformemente por toda a planta.

Como observado por RODRIGUEZ (1995) que comparou o efeito de diversos extratos de *M. azedarach* sobre o 4º instar de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, e verificou que os extratos de caule obtiveram ação “deterrence”. Ao mesmo tempo, os extratos de folhas e de frutos foram fagoestimulantes. Este resultado permite inferir que existe variação nos compostos químicos presentes nas diferentes partes botânicas dessa planta.

O estudo mostrou que dependendo das condições em que os ensaios foram realizados as potências das duas plantas selecionadas demonstraram diferenças. Isso pode sugerir que a atividade larvicida e a quantidade dos componentes presentes variam de espécie para espécie e depende do solvente utilizados nos extratos.

Extratos de frutos de *M. azedarach* quando aplicados na presença de larvas de *Liriomyza huidobrensis* culminaram com o crescimento de larvas deformadas que se apresentaram parcialmente apodrecidas e de coloração marrom. O que indica que o extrato de frutos pode ter atividade reguladora de crescimento (HAMMAD, NEMER e KAWAR, 2000).

As larvas de *A. aegypti* em presença de *MaMeOH* à 30°C com alimento apresentaram a menor  $CL_{50} = 4,4\text{mg}/\%$  e em presença de *A.iEtOH* também a 30°C e com alimento resultaram uma  $CL_{50} = 17,2\text{g}/\%$  sendo ainda superada pelo menor valor encontrado com *M. azedarach*.

Os ensaios com os piores resultados foram: *MaCM* à 25°C sem alimento com  $CL_{50} = 0,302643\text{g}/\%$  e para *AiCM* também a 25°C com alimento  $CL_{50} = 1,475195\text{g}/\%$ .

ISMAN (1994) indicou que os compostos vegetais não persistem muito tempo no meio ambiente e que seus parâmetros farmacocinéticos os faz muito pouco tóxicos aos organismos superiores, e que os extratos provocam menores danos ao meio ambiente, podendo ser considerados inseticidas biodegradáveis, pois não causam distúrbios no ecossistema e, conseqüentemente, não causaram deflagração de novas pragas, como os inseticidas comuns estão sujeitos a fazer.

A resistência é definida como uma característica herdada que comunica um aumento da tolerância para pesticidas, ou grupo de pesticidas, tal qual a resistência individual de sobrevivência à concentração de compostos que normalmente seriam letais para a espécie (WHO, 1992).

A intensidade da resistência de uma população de inseto vetor é dependente do volume e da freqüência de aplicações de inseticidas usados contra eles e das características hereditárias da espécie envolvida (HEMINGWAY e RANSON, 2000).

No Brasil, nas regiões de São Paulo e Goiás, e em outras regiões da América do Sul e Central, têm-se registrado a ocorrência de resistência de larvas de *A.aegypti* a alguns organofosforados e alguns piretróides (MAZZARRI e GEORGHIOU, 1995; RAWLINS, 1998; WIRTH e GEORGHIOU, 1999; CAMPOS e ANDRADE, 2001).

A capacidade de resistência aos organofosforados se associa com a desintoxicação mediada por enzimas de atividade específica, carboxilesterases. A possível função das enzimas específicas no processo de desintoxicação de inseticidas por *A.aegypti* foi

observada em larvas na região de Cuba. Isto sugere que o mecanismo utilizado seja mediado por esterases, pois se obteve altos índices de atividade glutathion-s-transferase (RODRIGUÉZ et.al., 1999).

A evolução da resistência em populações do campo é devido à seleção de genes resistentes, os quais aparecem em um novo mutante nas populações tratadas ou são importantes para imigração ativa ou passiva para outras áreas (PASTEUR e RAYMOND, 1996).

### 5.5 Diferenciação de espécimes por PCR

O caráter anátomo – morfológico mais patente para a diferenciação entre as duas Meliáceas estudadas são indubitavelmente os frutos maduros e ainda mais os respectivos caroços. Para o Cinamomo o aspecto macroscópico é mais arredondado e de cor castanho escuro. Para o nim o fruto maduro é ligeiramente mais alongado e de cor creme – clara. No que tange os caroços, o cinamomo se caracteriza por um envoltório ligno-celulósico rígido, de extrema resistência e dureza (endocarpo) com 5 a 6 lóculos distintos, separadas por reentrâncias, cada lóculo encravado uma ou duas sementes cobertas com tegumento (testa) de cor marrom escuro. Para o nim, uma única semente, está envolvida por uma cobertura ligno-celulósica lisa (endocarpo), alongada, cuja separação mecânica é fácil (como se fosse um pistache).

Como as folhas de ambas Meliáceas também encerram parte dos bioativos presentes nos frutos, decidiu-se utilizar folhas das duas espécies para a extração das respectivas populações de DNA total e então diferenciar as plantas pela clássica técnica de RAPD – PCR (*Randon Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction*).

As figuras 5.14 e 5.15 são ilustrativas dos resultados encontrados quando se utilizaram *Taq Polimerase* (enzima amplificadora de bactéria *Thermus aquaticus*) com o coquetel doador tradicional (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) na presença de *primers* curtos da Operon Technologies®.

Detalhes anátomo – morfológico das sementes se completam harmonicamente com os resultados de RAPD – PCR foliar. Se tomados em conjunto também se completam na



convincente concretização e diferenciação das duas espécies de Meliáceas, posto que em tempo de não frutificação a distinção visual entre os gêneros e suas respectivas espécies é dificultoso ao leigo.

Alguns “*primes*” encorajam resultados diferenciais muito claros (caso de OPA 4, 5, 10, 13 e 18) enquanto outros padrões de amplificação foram pobres em intensidade ou em diferenciação (caso de OPA 1, 6, 8 e 14).

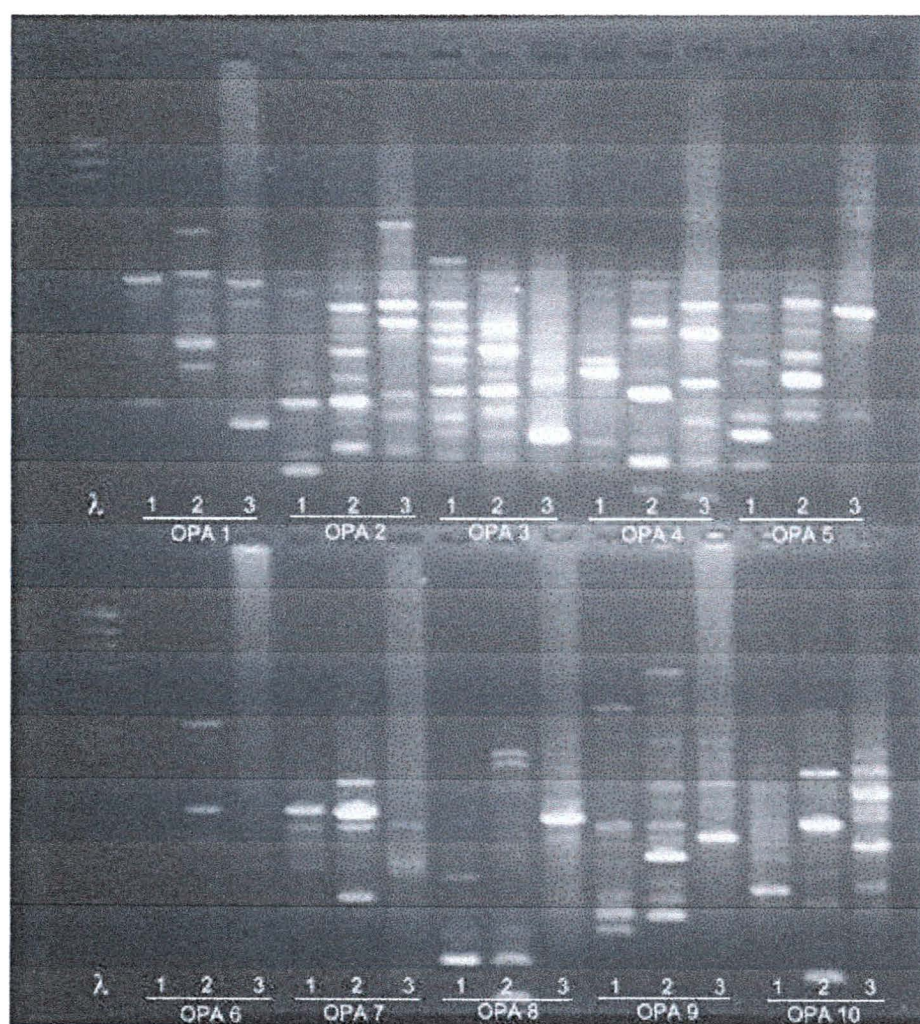


FIGURA 5.11: Amostras de RAPD em gel de agarose 1%; 1- *Azadirachta indica*; 2- *Melia azedarach* e 3- *Zea mays*.

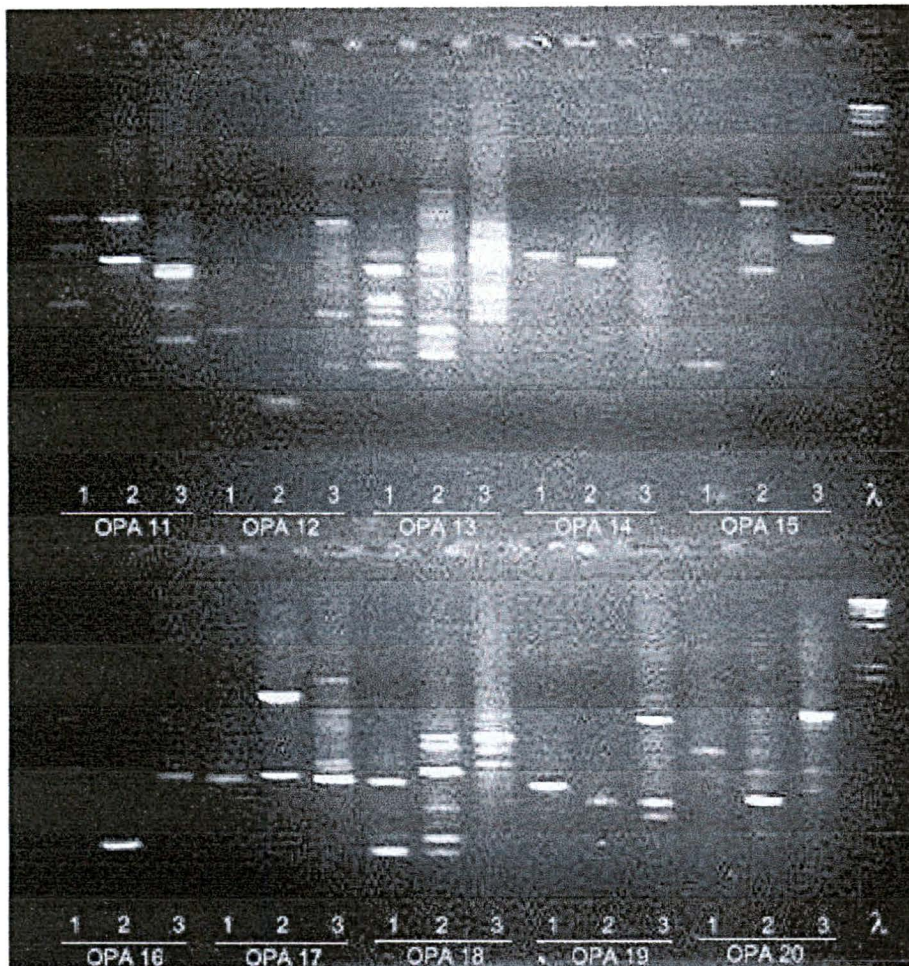


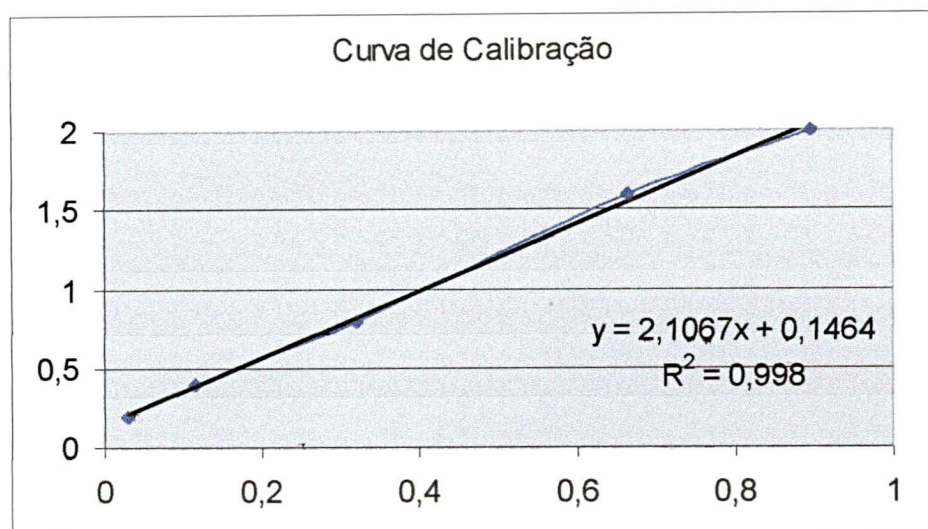
FIGURA 5.12: Amostras de RAPD em gel de agarose 1%; 1- *Azadirachta indica*; 2- *Melia azedarach* e 3- *Zea mays*.



## 5.6 Determinação de carboidratos redutores

Pelo método 3,5 dinitrossalicílico (DNS), descrito por Miller (1959).

GRÁFICO 5.11: Curva de calibração



O sobrenadante aquoso da polpa de frutos maduros de *M. azedarach* foi diluído 1:100 e então determinado a concentração de açúcares redutores da amostra.

A amostra apresentou um resultado de 7,6g/%.

## 5.7 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise do perfil de açúcares livres do sobrenadante aquoso de polpa de fruto maduro de *M. azedarach* (SL2) permitiu a detecção de glucose e frutose em qualquer das diluições testadas 1:10, 1:20 e 1:40.

A glucose apresentou pico de retenção em 10,851 minutos e a frutose em 12,371, com os quais foram correlacionados os picos obtidos nas amostras e determinadas as concentrações de cada um deles. A amostra apresentou então uma concentração de 3,12 g/% de glucose e 3,4g/% de frutose (6,52g/% no total), indicando claramente que a fonte

maior de poder redutor no fruto em maturação advém da sacarose e não de amiláceos ou pectinas.

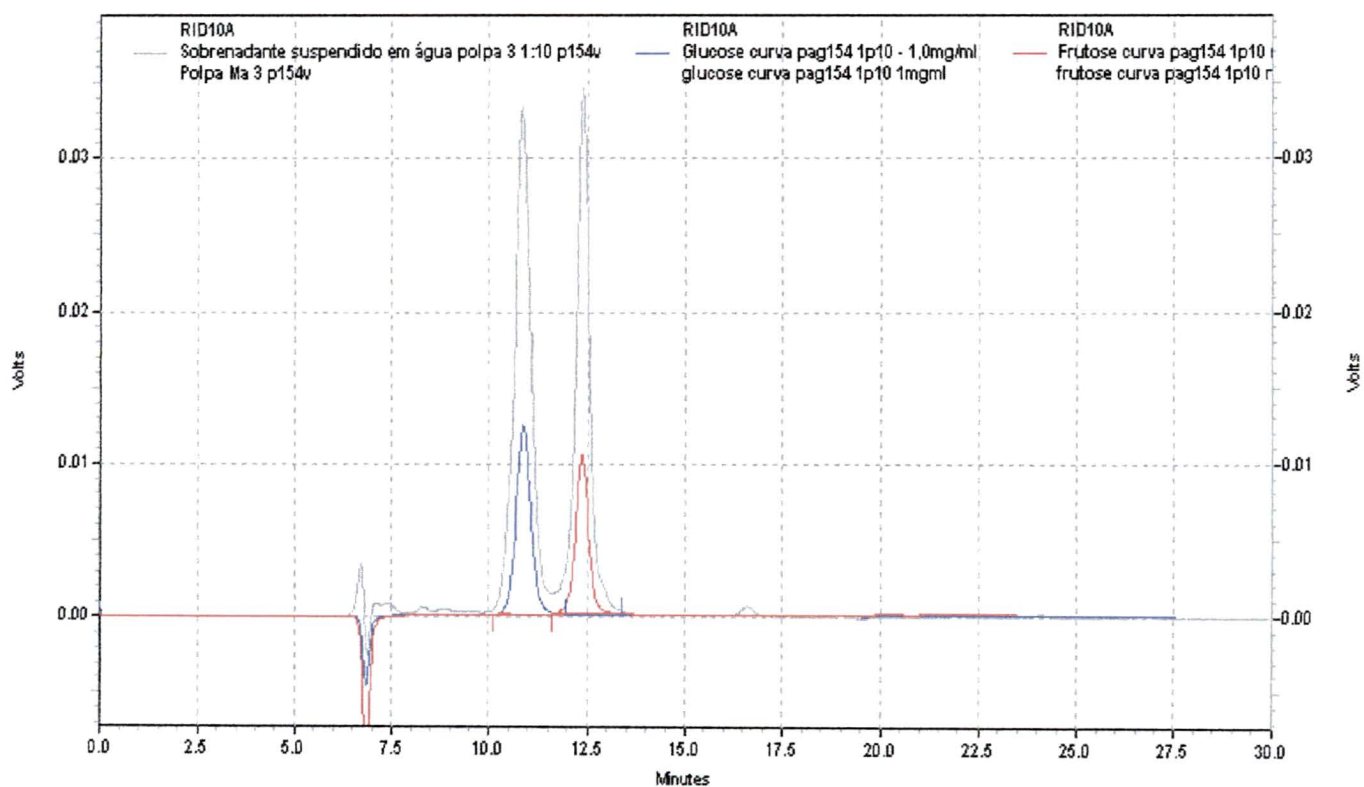


FIGURA 5.13: Cromatograma de polpa hidrossolúvel de frutos de *M.azedarach* comparativamente aos padrões de glucose e frutose, monitorados por RID (Refratometria diferencial).

## 5.8 Resultado do crescimento de *Xanthophyllomyces dendrorhous* em polpa de frutos de *Melia azedarach*.

O experimento realizado durante o período de 144 horas demonstrou que a polpa de *Melia azedarach* é uma fonte promissora para crescimento e astaxantinogênese da levedura rósea - alaranjada *X. dendrorhous*, mesmo naqueles cultivos sem complementação nutricional, como demonstra a TABELA 5.12.

TABELA 5.12: Experimento A

Cultivo	Astaxantina*	Biomassa**
1) SL2 1:2	166	886
2) SL2 1:5	347	590
3) SL2 1:5 + 0,1g% de fosfato de amônio	422	667
4) SL2 1:5 + 0,1g% de extrato de levedura	267	658
5) SL2 1:5 + 0,1g% uréia	315	653
6) Glucose 2% + 0,1g% extrato de levedura	361	534

FONTE: A autora

NOTAS: \*  $\mu\text{g}$  de astaxantina / g de células secas

\*\* mg de células secas / 100 ml de meio

O cultivo 1 realizado com a polpa SL2 (1:2 com 3,8g/% de açúcares redutores) foi o que apresentou maior produção de biomassa, 886 mg/100ml de meio, mas a produção de astaxantina de 166  $\mu\text{g}$  de astaxantina/ g de células secas, foi a menor de todos os cultivos, sugerindo que a concentração relativa de algum inibidor fosse estar se expressando em detrimento mais hierarquizador, o pigmento carotenóide. A farta previsão de carboidratos, obviamente, garante uma grande biomassa do microorganismo, mas de qualquer forma acrescem do máximo teórico esperado ( $\square 0,5 = 3,8/2 = 1,9\text{g}$ ). Já na diluição 1:5 (ensaio 3) o  $\square 0,5$  situa-se de melhor forma com 0,667g correspondem a 88% do teórico máximo esperado,  $3,8/2 = 0,78\text{g}$ . Outro cultivo feito somente com a polpa SL2, mas diluída 1:5 (com

1,52g/% de açúcares redutores), cultivo 2, apresentou biomassa de 590 mg/ml, e a produção de astaxantina, 340 µg de astaxantina/ g de células secas, foi o dobro do cultivo 1.

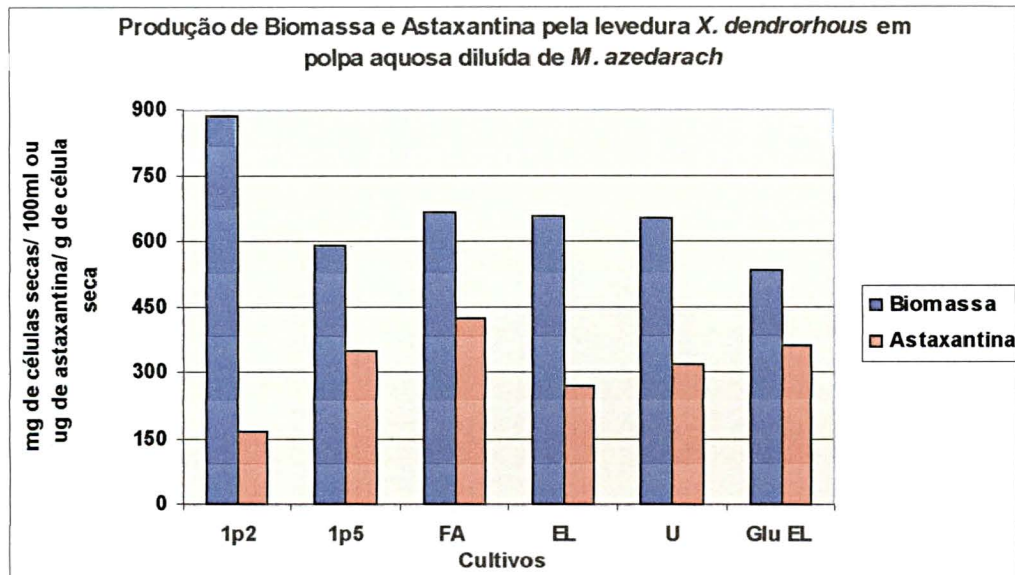
Analisando os resultados dos cultivos 4 e 6, estes que comparam a polpa SL2 com a glucose, ambos como fonte de carbono, suplementados respectivamente com 0,1g% de extrato de levedura, verifica-se que a polpa SL2 também apresentou efeito estimulador da produção de biomassa quando comparada com a glucose, 658 contra 534 mg/100ml. Altas concentrações de nitrogênio, geralmente, estimulam a produção de biomassa. Quando comparados os resultados dos cultivos 3, 4 e 5, todos com complementação nitrogenada, a produção de biomassa 667, 658 e 653 mg de células secas/ 100ml de meio respectivamente, é pelo menos 10% maior do que a biomassa do cultivo feito somente com a polpa sem suplementação nitrogenada, cultivo 2, demonstrando o efeito positivo do nitrogênio com relação a produção da biomassa.

O nitrogênio pode estar interferindo no direcionamento do acetil-COA. A astaxantina é produzida a partir da via do mevalonato. Por sua vez, o ácido mevalônico é formado a partir do acetil-COA. Dependendo das condições do meio, como concentração de nitrogênio, o acetil-COA pode estar sendo direcionado para a produção de biomassa em detrimento da produção de astaxantina. É o que parece ocorrer nos ensaios 4 e 5 enquanto que no ensaio 3, o fosfato combinado com Nitrogênio na forma amoníaca faz a diferença tanto a favor da biomassa quanto da astaxantina (2 parâmetros máximos).

O cultivo 3, complementado com 0,1g% de fosfato de amônio monobásico, foi o experimento que apresentou o melhor rendimento biomassa/astaxantina. A produção celular foi de 667mg/100ml de meio, próximo dos demais experimentos, e a produção de astaxantina, 422 µg de astaxantina/ g de células secas, foi bem superior aos outros cultivos. Segundo PASSOS (2002), o amônio apresenta um efeito astaxantinogênico na levedura *X. dendrorhous*.



GRÁFICO 5.12- Produção de biomassa e astaxantina pela levedura *X. dendrorhous* em polpa aquosa diluída de *M. azedarach*.



Uma medida dos teores de açúcares redutores residuais indica que entre 72 a 144 horas de cultivo, aqueles se reduziram de 0,5g/% para praticamente zero.

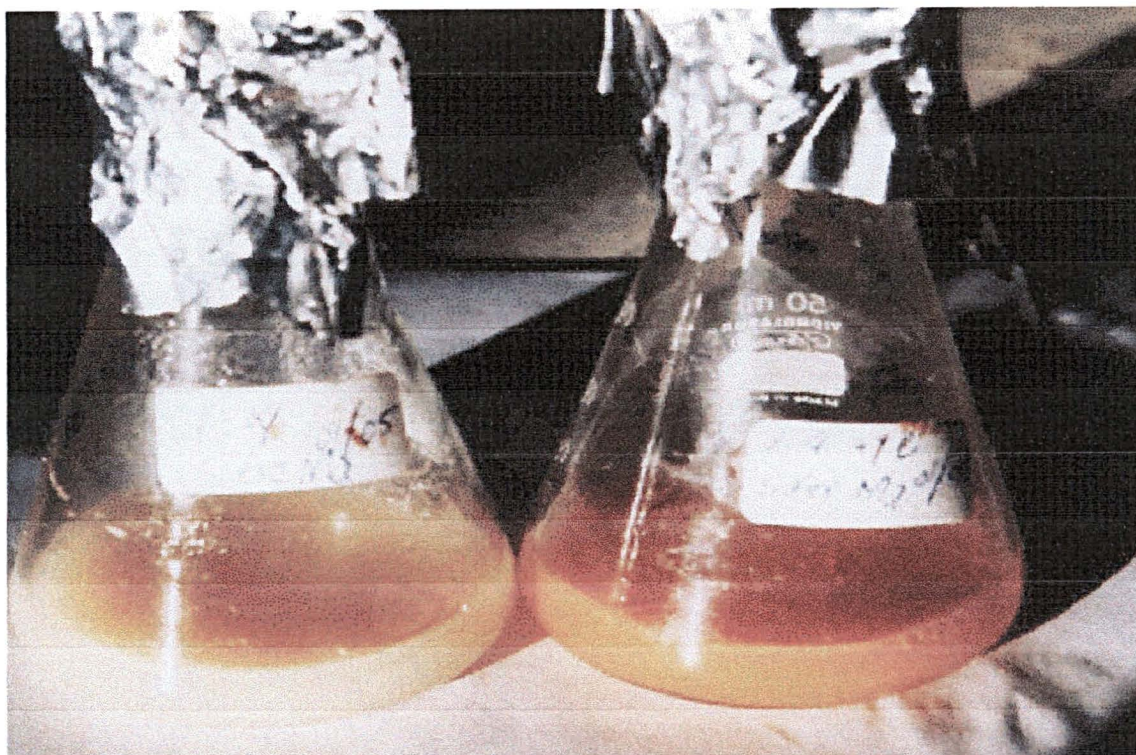


FIGURA 5.14: Produção de astaxantina pelo crescimento da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* em polpa de frutos maduros de *Melia azedarach* L.

NOTA: Erlenmeyer da esquerda controle com pouca pigmentação

Erlenmeyer da direita com sobrenadante aquoso de polpa de fruto madura de *M. azedarach* com pigmentação róseo-alaranjada.



## 6. CONCLUSÕES

1. Verificou-se que o BSLT é um método eficiente para identificação de plantas que apresentarem propriedades inseticidas.
2. Verificou-se que os extratos etanólico, metanólico e clorofórmico: metanólico de caroços inteiros de frutos maduros *Melia azedarach* (cinamomo ou santa bárbara) podem ser utilizados no controle biológico do mosquito da dengue atuam na inibição do ciclo morfogênético de *Aedes aegypti*, ou seja, interrompendo a evolução das larvas até pupa e adulto. E como consequência na prevenção dessa doença.
3. Os bioensaios realizados a 25°C com extrato etanólico e com alimentação das larvas, portanto, em ambiente que melhor representa as condições naturais, o extrato de *Melia azedarach* obteve CL<sub>50</sub> e CL<sub>95</sub> menores que aqueles obtidos com *Azadirachta indica*, a árvore nim, uma meliácea assemelhada.
4. Os extratos feitos com a mistura de solvente clorofórmio:metanol de *Melia azedarach* tanto no bioensaio com e sem alimento a 25°C e também a 30°C com larvas alimentadas resultaram em concentrações letais menores do que aqueles realizados com extratos isólogos de *Azadirachta indica*.
5. Os bioensaios realizados com extrato metanólico de *Melia azedarach* à temperatura de 25°C e 30°C com e sem alimento foram os que resultaram na mais eficiente preparação letal para larvas do mosquito da dengue com uma CL<sub>50</sub> de apenas 4,4 mg/100mL de meio no bioensaio e muito mais eficientemente que o extrato similar de nim.
6. Os extratos hidrossolúveis de polpa de frutos de *Melia azedarach* se mostraram uma ótima fonte para crescimento da levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* e produção de astaxantina.
7. O método de PCR por RAPD (amplificação randômica de ácido deoxirribonucléico polimórfico) se mostrou eficaz para diferenciação dos dois espécimes de *Meliaceae*, quando se utilizaram folhas como fonte de DNA.
8. CLAE dos diferentes extratos brutos de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica* se mostrou promissor na separação e diferenciação dos compostos presentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATAN, M. O; MAKINDE, M. J. Screening *Azadirachta indica* and *Pisum sativum* for possible antimalarial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 85 - 93, jul. 1986.
- ACHEAMPONG, E. A.; MARTIN, A. M. Kinetic studies on the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, p. 147- 155, 1995.
- ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. 3ª edição. Nova Iorque: Garland Publishing, 1994.
- AMBROSINO, P.; FRESA, R.; FOGLIANO, V.; MONTI, S. M. e RITIENI, A. Extraction of azadirachtin A from Neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 47, p. 5252-5256, 1999.
- AN, G. H. Improvement growth of red yeast, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), in presence of tricarboxylic acid intermediates. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1005- 1009, 2001.
- ANDREI, G. M.; COTO, C. E.; TORRES, R. A. Assays of cytotoxicity and antiviral activity of crude and semipurified extracts of green leaves of *Melia azedarach* L. **Revista Argentina Microbiol.**, v. 17, n. 4, p. 187 - 194, 1985.
- ANDREI, G. M.; LAMPPURI, J. S.; COTO, C. E.; TORRES, R. A. An antiviral factor from *Melia azedarach* L. prevents Tacaribe virus encephalitis in mice. **Experientia**, v. 42, n. 7, p. 843 - 845, jul. 1986.
- ANDREI, G. M.; DAMONTE, E. B.; TORRES, R. A., COTO, C. E. Induction of a refractory state to viral infection in mammalian cells by a plant inhibitor isolated from leaves of *Melia azedarach* L. **Antiviral Res.**, v. 9, n. 4, p. 221 - 231, jul. 1988.

AQUATEC INCORPORATION. **Astaxanthin research summaries**. Disponível em: <http://www.astaxanthin.org> acessado em 13 de janeiro de 2003.

ARA, I.; SIDDIQUI, B. S.; FAIZI, S.; SIDDIQUI, S. Two new terpenoids from root bark of *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v.52, n. 6, p. 1209 - 1213, nov./dec. 1989.

BENENCIA, F.; COURREGES, M. C.; MASSOUH, E. J.; COULOMBIE, F. C. Effect of *Melia azedarach* L. leaf extracts on human complement and polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, n. 1-2, p. 53 - 57, 1994.

BOHNENSTENGEL, F. I.; WRAY, V.; WITTE, L.; SRIVASTAVA, R. P. e PROKSCH, P. Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 977-982, 1999.

BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomices dendrorhous*) a partir de meios de cultura de baixo custo**. Curitiba, 1999, 158f. Tese (Doutorado em Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná).

BREUER, M.; DEVKOTA, B. Control of *Thaumetopoea pityocampa* (Den. And Schiff.) by extract of *Melia azedarach* L. (Meliaceae). **Journal Applied Entomology**, v. 110, n. 2, p. 128 - 135, 1990.

BREUER, M.; DE-LOOF, A. Meliaceous plant preparations as potencial insecticides for control oak processionary, *Thaumetopoea processionea* (L.) ( Lepidoptera: Thaumetopoeidae). **Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent**, v. 63, n. 2B, p. 529-536, 1998.

BROWN, A. W. A. Insecticide Resistance in Mosquitoes: A pragmatic review. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 2, n. 2, p. 123-140, June 1986.

BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuttha absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 455 - 459, 2001.

CALO, P.; GONZALES, T. The yeast *Phaffia rodhozyma* as an industrial source of astaxanthin. **Microbiologia Sem**, v. 11, p. 386- 388, 1995.

CAMPOS, J. e ANDRADE, C. F. S. Larval susceptibility to chemical insecticides of two *Aedes aegypti* population. **Journal of Public Health**, v. 35, n. 2, p. 232-236, 2001.

CAN - XI, Z. Effect of *Melia azedarach* extract on schistosomiasis im mice. **Chinese Medical Journal**, China, v. 97, n. 12, p. 910 - 912, 1984.

CARPINELLA, M. C.; HERRERO, G. G.; RUBEN, A. A., PALACIOS, S. M. Antifungal activity of *Melia azedarach* fruit extract. **Fitoterapia**, v. 70, p. 296 - 298, 1999.

CASTILLA, V.; BARQUERO, A. A.; MERSICH, S. E.; COTO, C. E. In vitro anti-Junin virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. **International Journal Antimicrobiology Agents**, Netherlands, v. 10, n. 1, p. 67 - 75, apr. 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) **Reinfestação de *A. aegypti* no continente Americano**, disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/slideset/set1/images/reinfestation-by-aedes-aegypti.gif>, acessado em 16 de janeiro de 2004.

CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. e TOWERS, G. H. N. Biological activity of limonoids from the rutales. **Phytochemistry**, Great Britain, v. 31, n. 2, p. 377 - 394, 1992.

CHEN, C. C.; CHANG, S. J.; CHENG, L. L. HOU, R. F. Deterrent effect of chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Yponomeutidae). **Journal Applied Entomology**, v. 120, n. 3, p. 165 - 169, 1996.

CHIARAVALLOTI, F. N. Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Brasil, v. 30, n. 4, p. 279 – 285, 1997.

CONSOLI, R. G. B. e LOURENÇO – DE –OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Editora: Fiocruz, Brasil, p. 225, 1994.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: New York Botanical Garden, 1988.

DIKE, A. O.; LETTENER, F.; ZOLLITSCH, W. The supplementation of layers feed with the yeast – *Phaffia rhodozyma* – as pigment carrier. **Archiv für Geflügelkunde**, v. 5, p. 205- 209, 1992.

DILAWARI, V. K.; SINGH. K.; DHALIWAL, G. S. Effects of *Melia azedarachi* L. on oviposition and feeding of *Plutella xylostella* L. **Insect. Science Applied**, v. 15, n. 2, p. 203 - 205, 1994.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12 p. 13- 15, 1990.

DZUL, F.; TUN-KU, E.; ESPADAS, C.; BURGOS-RUIZ, D.; MANRIQUE-SAIDE, P. Efecto de macerados acuosos de *Nim Azadirachta indica* (Meliaceae) em la sobrevivencia del mosquito transmisor de la fiebre amarilla *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). **Folia Entomológica**, v. 41, n. 2, p. 257- 259, 2002.

FANG, T. J.; CHENG, Y. S. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rodhozyma* through mutation and optimization of culture conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 6, p. 466- 469, 1993.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Ram Nagar, New Delhi; Ed. S. Chand & Company Ltd, 1981. p. 333.

FONTANA J. D.; ASTOLFI FO S.; ROGELIN R.; KAISS J.; HAULY M. C. O.; FRANCO V. C. e BARON M. PCR Protocol - and Inulin Catabolism-Based Differentiation of Inulinolytic Soil Bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**.v.45/46,p.269-282,1994.

FONTANA, J. D.; CZECHUGA, B.; BONFIM, T. M. B.; CHOCIAI, M. B.; OLIVEIRA, B. H.; GUIMARÃES, M. F.; BARON, M. Bioproduction of carotenoids: The comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rodhozyma*. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 121- 125, 1996.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L F.; PASSOS, M. Carotenoides. **Biociência – Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 13, p. 40-45, 2000.

FONTANA, J. D. Publicação de pedido de patente. **Revista Propriedade Industrial**, 1617, p. 132, 2 de janeiro de 2002.

FORATTINI, O. P.; KAKITANI, I.; SALLUM, M. A. M.; REZENDE de L. Produtividade de criadouro de *Aedes aegypti* em ambiente urbano. **Revista de Saúde Pública**. V. 31, n. 6, p. 545 – 555, 1997.

FORATTINI, O. P. Família Culicidae: Biologia das Formas Imaturas. In: FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**, v. 2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002(a). p. 51 – 96.

FORATTINI, O. P. Biologia Geral das Formas Adultas. In: FORATTINI, O. P. **Culicidologia Médica**, v. 2. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002(b). p. 97 – 130.

FUKUYAMA, Y.; OGAWA, M.; TAKAHASHI, H., MINAMI, H. Two new Melicarpinins from the roots of *Melia azedarach*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 48, n. 2, p. 301 - 303, 2000.

GEBRE, A. A.; AZEREFEGNE, F. Insecticidal activity of chinaberry, endod and pepper tree against the maize stalk borer. **International Journal of Pest Management**, v. 45, n. 1, p. 9 - 13, jan./mar. 1999.

GOLUBEV, W. I. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous*(*Phaffia rhodozyma*). **Yeast**, v. 11, p. 101- 110, 1995.

GONÇALVES, M. E. C.; OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; TORRES, J. B. Effect of plant extracts on immature stages and adults females of *Mononychellus tanajoa* (Bondar) (Azari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology**, v. 20, n. 2, p. 305 - 309, 2001.

GLUBER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, July 1998.

GLUBER, D.J. Epidemic Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever as a Public Health, Social and Economic Problem in the 21<sup>st</sup> Century. **TRENDS in Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 100-103, February 2002.

GUZMÁN, M. G. e KOURI, G. Dengue: an Update. **Infectious Diseases**, v. 2, p. 33-42, January 2002.

HAARD, G. J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rodhozyma* on molasses. **Biotechnology Letters**, Middlesex, v. 10, n. 9, p. 609- 614, 1988.

HAMMAD, E. M. A-F.; NEMER, N. M.; HAWI, Z. K.; HANNA, L. T. Responses of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, to the chinaberry tree (*Melia azedarach* L.) and its extracts. **Ann. Applied Biology**,v. 137, p. 79 - 88, 2000a.

HAMMAD, E. M. A-F; NEMER, N.M.; KAWAR, N. S. Efficacy of chinaberry tree( Meliaceae) aqueous extracts and certain insecticides the pea leafminer ( Diptera: Agromyzidae ). **Journal of Agricultural Science**, v. 134, n. 4, p. 413 - 420, jun. 2000b.

HAN, J.; LIN, W. H.; XU, R. S.; WANG, W. L.; ZHAO, S. H. Studies on the chemical constituents of *Melia azedarach* L. **Acta Pharmaceutica Sinica**, China, v. 26, p. 426 - 429, jun. 1991.

HARE, W. R.; SCHUTZMAN, H.; LEE, B. R.; KNIGHT, M. W. Chinaberry poisoning in two dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, United States, v. 210, n. 11, p. 1638 - 1640, jun. 1997.

HEMINGWAY, J. e RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. **Annual Review Entomology**, v. 45, p. 371 - 391, 2000.

HOTCHKIN, P. G. The duration of larval life of *Aedes aegypti* as affected by time of hatch. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 1, n. 4, p. 489 - 492, 1985.

HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K.; NAKATANI, M. Azedarachin C, a limonoid antifeedant from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 593 - 594, 1995.

HUANG, R. C.; TADERA, K.; YAGI, F.; MINAMI Y.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T. e NAKATANI, M. Limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 581-583, 1996.

ISMAIL, S. M. M. Selectivity and joint action of *Melia azedarach* L. fruti extracts with certain acaricides to *Tetranychus urticae* Koch and *Stethorus gilvifrons* Mulsant. **Ann. Agricultural Science**, v. 35, n. 1, p. 605 - 618, 1997.

ISMAN, M. O. Botanical insecticides and antifeedant: new sources and perspectives. **Pestic. Res. Journal**, v. 6, p. 9 -11, 1994.

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M.J. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Journal of General Microbiology**, Regarding, v. 115, p. 173-183. 1979.



JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. J.; GRAU, C. R. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rodhomya*. **Poultry Sciences**, Champaign, v. 59, p.1777- 1782, 1980.

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxantin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 11, n. 4, p. 297- 326, 1991.

JOHNSON, S.; MORGAN, E. D. Comparison of chromatografic systems for triterpenoids from Neem ( *Azadirachta indica* ) seeds. **Journal of chromatography A**, v. 761, p. 53 - 63, 1997.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 8. ed. São Paulo: Nacional, 1987.

JUAN, A.; SANS, A.; RIBA, M. Antifeedant activity of fruit and seed extracts of *Melia azedarachi* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides*. **Phytoparasitica**, v.28, n. 4, p. 311 - 319, 2000.

KANEDA, M.; ARIMA, K.; YONEZAWA, H. e UCHIKOBA, T. Purification and properties of a protease from the sarcocarp of bead tree fruit. **Phytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 1395- 1398, 1994.

KARNAVAR, G. K.; DLAMINI, M. P. Pesticidal and other properties of neem, *Azadirachta indica* and related species - An overview. **Journal of Animal Morphology and Physiology**, v. 45, n. 1-2, p. 1 - 14, jun./dec. 1998.

KHALID, S. A. DUDDECK, H.; GONZALEZ- SIERRA, M. Isolation and characterization of na antimalarial agent of the *Neem* tree *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 5, p. 922 - 927, sept./oct. 1989.

KIGODI, P. G. K.; BLASKO, G.; THEBTARANONTH, Y., PEZZUTO, J. M.; CORDELL. G. A. Spectroscopic and biological investigation of nimboide and 28 -

deoxonimbolide from *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1246 - 1251, nov./dec. 1989.

KLEIN, R. M. **Flora Ilustrada Catarinense Meliáceas**. Itajaí – SC, 1984. p. 5- 8.

KUMAR, C. S. S. R.; SRINIVAS, M. e YAKKUNDI, S. Limonoids from the seeds of *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 451-455, 1996.

KUMAR, R.; SINGH, R.; RANI, M.; SUHAG, P.; KALIDHAR, S. B. Biological efficacy of *Melia azedarach* stems against lepidopterous pests. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1074 - 1078, dec. 1999.

LIGNELL, A. **Method for increasing the production of/in breeding and production animals in poultry industry**. United States Patent n. 5744502, 1998.

MACLEOD, J. K.; MOELLER, P. D. R.; MOLINSKI, T. F.; KOUL, O. Antifeedant activity against *Spodoptera litura* larvae and (super(13) C) NMR spectral assignment of the melitoxins. **Journal Chemistry Ecology**, v. 16, n. 8, p. 2511 - 2518, 1990.

MACORIS, M. de L. G.; ANDRIGHETTI, M. T.; TAKAKU, L.; GLASSER, C. M.; GARBELOTO, V. C. e CIRINO, V. C. B. Alteration in Susceptibility Response of *Aedes aegypti* Organophosphates in Cities in the State of S. Paulo, Brazil. **Journal of Public Health**, v. 33, n. 5, p. 521-522. Oct. 1999.

MARCO, J. A.; BARBERÁ, O.; SANZ, J. F.; PARAREDA, S. Flavonol diglycosides from *Melia azedarach*. **Journal of Natural Products**, v.49, n. 1, p. 170, june 1985.

MAREGGIANI, G.; LEICHACH, S.; LANER, P. Toxicity of secondary metabolites extracts from different organs of *Melia azedarach* to the root knot nematode. **Fitopatologia**, v. 33, n. 2, p. 122 - 126, jun. 1998.

MARTINEZ, S.S. **O Nim – *Azadirachta indica* – Natureza, Usos Múltiplos, Produção**. 1. ed. Londrina: IAPAR, 2002.

MAZARRI, M. B. e GEORGHIOU, G. P. Characterization of resistance to organophosphate carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11, n. 3, p. 315-322, 1995.

MAX PLANCK INSTITUT FÜR CHEMISCHE ÖKOLOGIE, **Azadirachtin** disponível em <http://www.ice.mpg.de/departments/ms/Research/Neem/azadirachtin.jpg>, acessado 02/05/2003.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JASCOBSEM, L. B.; NICHOLS, D. E.; MACLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**. V. 45, n. 1, p. 31- 34, 1982.

MEYER, P. S.; PREEZ, J. C.; KILIAN, S. G. Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 514- 520, 1993.

MEYER, P. S.; PREEZ, J. C. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 178-183, 1994.

MILLER, G.L. Use a dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426- 428, 1959.

MILLER, M. W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycocetes). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n.2, p. 286- 291, 1976.

MITCHELL, M. J.; SMITH, S. L.; JOHNSON, S. e MORGAN, E. D. Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 35, p. 199-209, 1997.

MONZON, R. B.; ALVIOR, J. P.; LUCZON, L. L. C.; MORALES, A. S.; MUTUC, F. E. S. Larvicidal potencial of five philippines plants against *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Southeast Asian Journal Tropical Medicinal Public Health**, v. 25, n. 4, dec. 1994.

MORDUE, A. J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal Insect. Physiology**, v. 39, p. 903 - 924, 1993.

NAKATANI, M.; HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; NAOKI, H.; IWAGAWA, T. Limonoid antifeedants from chinese *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 1, p. 39 - 41, 1994.

NAKATANI, M.; HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K. Degraded limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1773 - 1776, 1998.

NASSEH, O. M.; AL-FURASSY, M. A. Studies on control of potato tuber moth larvae, *Phthorimaea operculella* (Zell) (Lep. Gelechiidae) by natural and chemical insecticidal in the Republic of Yemen. **Anz. Schaedlingkds. Pflanzenschutz umweltschutz**, v. 65, n. 8, p. 157 - 159, 1992.

NAT, J. M. van; HART, L. A.; SLUIS, W. G. van, DIJK, H. van; BERG, A. J. J. van den; SILVA, K. T. D. de ; LABARDIE, R. P. Characterization of anti-complement compounds from *Azadirachta indica*. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 27, p. 15 - 24, 1989.

NAYAK, S.; DEBATA, B. K.; SRIVASTANA, V. K.; SANGWAN, N. S. Evaluation of agronomically useful somaclonal variants in Jamrosa (a hybrid *Cymbopogon*) and detection of genetic changes through RAPD. **Plant Science**, v. 163, p. 1029- 1035, 2003.

PASSOS, M. **Valorização biotecnológica do hidrolisado fosfórico de amido de mandioca: produção de biomassa e astaxantina utilizando a levedura**

***Xanthophyllomyces dendrorhous***. Curitiba, 2002. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná) 151p.

PERTILE, R. A. de **Perspectivas da utilização de extratos brutos de Meliáceas como alternativa ao uso de organoclorados**. Rio de Janeiro, 1995. 185 f. Dissertação - Escola Nacional de Saúde Pública.

Panamerican Health Organization (PHO), **2003: Number of Reported Cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic fever (DHF) Region of the Americas (by country and subregions)**, disponível em [http://www.paho.org/English?AD/DPC/CD/dengue-cases\\_2003.htm](http://www.paho.org/English?AD/DPC/CD/dengue-cases_2003.htm) Acessado em 04 de julho de 2003.

PEREZ, M. P.; FERNANDEZ, L. D.; GUIRADO, O. A. A.; CAPOTE, R. V. e AGUILAR, G. G. Molluscicidal activity of Paraiso( *Melia azedarach* L.) (Meliaceae) on *Lymnaea cubensis*, host snail of Fasciolosis, **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 3, p. 262 - 266, jun. 1998.

RAWLINS, S. C. Spatial Distribution of Insecticide Resistance in Caribbean Populations of *Aedes aegypti* and its Significance. **Pan. Am. Journal Public Health**, v.4, n. 4, p. 243-251, 1998.

RODRIGUEZ, C. H. **Efeito de extratos aquosos de Meliaceae no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae)** Piracicaba, 1995. Tese de Doutorado, ESALQ/USP, 100p.

RODRIGUEZ, C. H.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Man. Int. Plagas**, v. 42, p. 14 - 22, 1996.

RODRIGUEZ, C. H.; VENDRAMIM, J. D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Revista Agric., Brasil**, v. 72, p. 305 - 318, 1997.

RODRIGUEZ, M. M.; BISSET, J. A.; MILÁ, L. H.; CALVO, E.; DÍAZ, C. e SOCA, L. A. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de sangre de Cuba. **Revista Cubana Medicina Tropical**, v.5, n. 2, p.83-88, 1999.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R. W. **Proc. Natl. Acad. Sci** , v. 81, p. 8014, 1984.

SCHIEDT, K.; LIAANEN- JENSEN, S. Isolation and Analysis. In: BRITTON, G.; LIAANEN- JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids**, Berlin:Birkhäuser Verlag, 1995. v. 1A, p. 81- 108.

SCHMIDT, G. H.; REMBOLD, H.; AHMED, A. A. I.; BREUER, M. Effect of *Melia azedarach* fruit extract on juvenile hormone titer and protein content in the hemolymph of two species of Noctuid Lepidoptera larvae (Insecta: Lepidoptera; Noctuidae). **Phytoparasitica**, v. 26, n. 4, p. 283 - 292, 1998.

SCHMUTTERER, H. First investigations of insecticidal effects of methanolic extracts from the leaves and bark of the Philippine neem tree, *Azadirachta integrifoliola* Merr., and comparison of these effects of those extracts from *Azadirachta indica* (A. Juss) and *Melia azedarach* L. **Journal Applied Entomology** , v. 108, n. 5, p. 483 - 489, 1989.

SCHMUTTERER, H. Properties and potencial of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review Entomology**, v. 35, p. 271-297, 1990.

SHAPIRO, M; ROBERTSON, J. L.; WEEB, R. E. Effect of neem seed extract upon the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae ) and its nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Economic Entomology**, v. 87, p. 356 - 360, 1994.

SCHROEDER, D. R.; NAKANISHI, K. A simplified isolation procedure for azadirachtin. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 50, n. 2, p. 241-244, mar./apr. 1987.

SIDDIQUI, S.; FAIZI, S.; TARIQ, M. e SIDDIQUI, B. S. Two new insect growth regulator meliacins from *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). **Journal of Chemistry Soc. Perkin Trans.**, p. 1021-1025, 1986.

SIDDIQUI, B. S.; AFSHAN, F.; GUIASUDDIN, FAIZI, S., NAQVI, S. N. H.; TARIQ, R. M. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 371 - 376. 2000.

SIGURGISLADOTTIR, S. Effect of feeding natural tocopherol and astaxanthin on Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fillet quality. **Food Research Intenational** , v. 24, p. 23- 32, 1994.

SINGH, A.; CHAUDHURY, A.; SRIVASTANA, P. S.; LAKSHMIKUMARAN, M. Comparison of AFLP and SAMPL markers for assesment of intra-population genetic variation in *Azadirachta indicia* A. Juss. **Plant Science**, v. 162, p. 17- 25,2002.

SLOSEK, J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. **Society Science Medical**, v. 23, n. 3, p. 249-257, 1986.

SOUZA, A. P. de; VENDRAMIM, J. D. Efeito de extratos aquosos de Meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. **Fitossanidade**, v. 59, n. 2, p. 173 - 179, 2000.

SOUZA, A. P. de; VENDRAMIM, J. D. Atividade inseticida de extratos aquosos de Meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci*( genn.) biótipo B ( Hemiptera: Aleyrodidae ) **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 133 - 137, 2001.

SRIVASTAVA, S. D. Limonoids from the seeds of *Melia azedarach*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 1, p. 56 - 61, jan./feb. 1986.

STOREBAKKEN, T. e NO, H. K. Pigmentation of rainbow trout. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 100, p. 209- 229, 1992.

TAKEYA, K.; QIAO, Z. S.; HIROBE. C.; ITOKAWA, H. Cytotoxic azadirachtin - type limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 709 - 712, 1996a.



TAKEYA, K.; QIAO, Z. S.; HIROBE, C.; ITOKAWA, H. Cytotoxic trichilin-type limonoids from *Melia azedarach*. **Bioorg. Med. Chem.**, England, v. 4, n. 8, p. 1355 - 1359, aug. 1996b.

TORRES, A. L.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J. V. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella*(L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 151- 156, 2001.

TORRISSEN, O. J; CHRISTIANSEN, R. Requirements for carotenoids in fish diets. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 11, p. 225- 230, 1995.

VALLADARES, G.; DEFAGO, M. T.; PALACIOS, S.; CARPINELLA, M. C. Laboratory evaluation *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 90, n. 3, p. 747 - 750, 1997.

VALLADARES, G. R.; FERREYRA, D.; DEFAGO, M. T.; CARPINELLA, M. C.; PALACIOS, S. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 421 - 424, 1999.

VÁZQUEZ, M.; SANTOS, V.; PARAJO, J. C. Effect of the carbon source on the carotenoid profile of *Phaffia rhodozyma* strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 263- 268, 1997.

VÁZQUEZ, M.; MARTIN , A. M. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 57, n. 3, p. 315- 320, 1998.

WACHSMAN, M. B.; CASTILLA, V.; COTO, C. E. Inhibition of foot and mouth disease virus (FMDV) uncoating by a plant derived peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. **Arch. Virol.** Austria, v. 143, n. 3, p. 581 - 590, 1998.

WACHSMAN, M. B.; COTO, C. E. Susceptibility of picornavirus to an antiviral of plant origin (meliacin) **Revista Argentina Microbiology**, Argentina, v. 27, n. 1, p. 33 - 37, jan./mar. 1995.

WANDSCHEER, C. B.; SILVA, M. A. N., LUNA, J. E. D., FONTANA, J. D. Controle Biológico de *Aedes (Stegomyia) aegypti*, Linnaeus (Díptera: Culicidae) utilizando extratos etanólicos de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica* (Rutales: Meliaceae). In: VII JORNADAS DE ZOOLOGÍA DEL URUGUAY/ III JORNADAS REGIONALES SOBRE MOSQUITOS, VII/ III, 2003, Montevideo – Uruguay. **Anais**. Montevideo: edição Especial Sociedade Zoológica Del Uruguay, 2003. página 139.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOSWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. 2ª edição. Nova Iorque: Freeman and Company, 1992.

WELSH, J. D.; McCLELLAND, M. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Reserch**, v. 18, p. 7213- 7218, 1990.

WILLIAMS, A. R.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p. 6531- 6535, 1990.

WIRTH, M.t C. e GEORGHIOU, G. P. Selection and Characterization of temophos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, Bristish Virgin Islands. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 15, n. 3, p. 315-320, 1999.

World Health Organization (WHO). **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. WHO/VBC/81.807, p. 6, 1981.

World Health Organization (WHO). **Division of Vector Biology and Control. Data sheet on biological control agent. *Bacillus thuringiensis* serotype H- 14 (de Barjac 1978)**. WHO/VBC/79.750, Rev. 1, p. 46, 1982.

World Health Organization (WHO), Vector resistance to pesticides. **WHO Technical Report Series**. Geneva, p. 2- 51, 1992.

World Health Organization (WHO), **Dengue and Dengue Hemaemorrhagic fever**, abril 2002, disponível em <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact117.html>> Acessado em 04 de julho de 2003.

World Health Organization (WHO), **Strategic direction for research**, fevereiro 2002, disponível em <<http://www.who.int/tdr/diseases/dengue/direction.htm>> Acessado em 04 de julho de 2003.

World Health Organization (WHO), **Dengue in Brazil, junho 1998**, disponível em <<http://www.who.int/disease-outbreak-news/n1998/jun/n8june1998.html>> Acessado em 04 de julho de 2003.

World Health Organization (WHO), **Dengue Update**, disponível em, <<http://www.who.int/tdr/publication/tdrnews/news66/dengue.html>> Acessado em 04 de julho de 2003.

ZAMBRANO, A. Y.; DEMEY, J. R.; FUCHS, M.; GONZÁLES, V.; REA, R.; DE SOUZA, O.; GUTIÉRREZ, Z. Selection of sugarcane plants resistant to SCMV. **Plant Science**, v. 165, p. 221- 225, 2003.

ZARROUG, I. M. A.; NUGUD, A. D.; BASHIR, A. K.; MAGEED, A. A. Evaluation of Sudanese plant extracts as mosquito larvicides. **Int. Journal Crude Drug. Res.**, v. 26, n. 2, p. 77-80, 1988.

ZEBITZ, C. P. W. Effect of some crude and azadirachtin- enriched neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. **Entomol. Exp. Appl.**, Netherlands, v. 35, p. 11- 16, 1984.